

Wechselwirkung immunmodulatorischer Zellen mit vaskulären Endothelzellen

Isabel Alexandra Hartmann

**Dissertation der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

München, 16. Dezember 2013

Die Dissertation wurde angefertigt
unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Elisabeth H. Weiss
unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Günther Eißner
an der Herzchirurgischen Klinik
Klinikum der Universität München - Campus Großhadern

Erstgutachterin:	Frau Prof. Dr. Elisabeth H. Weiss
Zweitgutachter:	Herr PD Dr. Josef Mautner
Mitgutachter:	Herr Prof. Dr. George Boyan Herr Prof. Dr. Heinrich Jung
Tag der Abgabe:	16.12.2013
Tag der mündlichen Prüfung:	22.09.2014

ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich ehrenwörtlich, dass meine Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt worden ist.

Die vorliegende Dissertation wurde weder ganz, noch teilweise bei einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

Ich habe noch zu keinem früheren Zeitpunkt versucht, eine Dissertation einzureichen oder an einer Doktorprüfung teilzunehmen.

München, den 30.11.2014

Isabel Alexandra Hartmann

Für meine Eltern

Wer dem Erfolg auf den Grund geht,
findet Beharrlichkeit.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
3	Zielsetzung dieser Arbeit	9
4	Material	10
4.1	Zellen	10
4.1.1	Primäre Zellen	10
4.1.2	Zelllinien	10
4.2	Medien	11
4.2.1	Kulturmedien	11
4.2.2	Einfriermedium	12
4.2.3	Differenzierungsmedien	12
4.3	Antikörper	13
4.3.1	Direkte Färbung	13
4.3.2	Indirekte Färbung	13
4.4	Zytokine	13
4.5	Kits und spezielle Reagenzien	14
4.6	Allgemeine Puffer und Lösungen	15
4.7	Weitere Verbrauchsmaterialien	15
4.8	Geräte	16
5	Methoden	17
5.1	Isolierung von Zellen	17
5.1.1	Isolierung von Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC)	17
5.1.2	Isolierung von mesenchymalen Stammzellen aus dem Nabelschnurgewebe (UCMSC)	17
5.1.3	Ficoll Dichtegradienten-Zentrifugation	19
5.1.4	Immunmagnetische Bead-Separation	19
5.2	Kultivierung von primären Zellen und Zelllinien	20
5.2.1	Zellkultur von adhärenenten Zellen und Suspensionszellen	20
5.2.2	Kryokonservierung von Zellen	21
5.2.3	Auftauen von Zellen	21

5.3	Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen aus dem Nabelschnurgewebe (UCMSC).....	21
5.3.1	OilRedO-Färbung	21
5.3.2	Alizarin Rot-Färbung.....	22
5.3.3	von Willebrand Faktor Färbung.....	22
5.3.4	Angiogenese	22
5.4	Proliferationsanalyse	23
5.5	Durchflusszytometrie	23
5.5.1	Immunfluoreszenzmarkierung von Zelloberflächenproteinen	23
5.5.2	Zytoplasmatische Immunfärbung	24
5.5.3	FACS-Analyse.....	24
5.6	Gemischte Lymphozytenreaktion	24
5.7	Zytotoxizitätsanalyse	25
5.8	ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)	26
6	Ergebnisse	28
6.1	Isolierung und Charakterisierung von mesenchymalen Stammzellen aus dem Nabelschnurgewebe (UCMSC) unter verschiedenen Kulturbedingungen	28
6.1.1	Isolierung von UCMSC	28
6.1.2	Charakterisierung von UCMSC unter verschiedenen Kulturbedingungen	29
6.1.3	Funktionelle Charakterisierung von UCMSC.....	32
6.1.4	UCMSC besitzen immunsuppressive Eigenschaften	36
6.1.5	Die immunsuppressive Wirkung von UCMSC basiert nicht auf direktem Zell-Zell-Kontakt	37
6.1.6	Die inhibitorische Wirkung von UCMSC ist Prostaglandin-abhängig.....	38
6.2	Regulatorische T-Zellen.....	41
6.2.1	Isolierung von CD4+/CD25+/FoxP3+ Treg-Zellen.....	41
6.2.2	Phänotypische Charakterisierung von Treg-Zellen	41
6.2.3	Funktionelle Charakterisierung von Treg-Zellen.....	43
6.3	Charakterisierung Endothel-spezifischer Alloreaktionen	43
6.3.1	Treg-Zellen verstärken die lytische Aktivität von CD8+/CD28- CTL	44
6.3.2	Phänotypische Charakterisierung von CD8+ zytotoxischen T-Lymphozyten....	47
6.3.3	Treg-Zellen verstärken die lytische Aktivität von CD8+/CD28-/CD57+ CTL	51
6.3.4	Immunsuppressive Wirkung von UCMSC auf das vaskuläre Endothel	52

6.4	eUCMSC im Zytotoxizitätstest.....	53
6.5	Pharmakologischer Schutz des vaskulären Endothels.....	54
7	Diskussion	57
8	Literaturverzeichnis	68
9	Anhang	77
9.1	Abkürzungsverzeichnis	77
9.2	Abbildungsverzeichnis	79
9.3	Tabellenverzeichnis	80
10	Publikationen	81
11	Eidesstattliche Erklärung.....	82
12	Danksagung.....	83
13	Lebenslauf	84

1 Zusammenfassung

Mesenchymale Stammzellen (MSC) sind multipotente Zellen mit der Fähigkeit sich in verschiedene Gewebezellen mesodermalen Ursprungs zu differenzieren, wie z.B. Osteoblasten, Chondrozyten, Adipozyten. Sie sind Plastik-adhärenente Zellen und besitzen eine Fibroblasten-ähnliche Morphologie. Ihre phänotypische Charakterisierung erfolgt über ein Expressionsmuster verschiedener Oberflächenmarker, da es nicht einen einzelnen spezifischen Marker für MSC gibt. Aufgrund ihrer immunsupprimierenden Eigenschaften und ihrer Plastizität werden MSC als potentielles Therapeutikum in der Transplantationsmedizin und für den Einsatz im *Tissue Engineering* gehandelt. MSC aus dem Nabelschnurgewebe (UCMSC) sind gegenüber MSC aus dem Knochenmark (BMMSC) eine leicht zugängliche Quelle, zur Isolierung der UCMSC ist kein operativer Eingriff notwendig. Neben der bereits bekannten Kultivierung von MSC mit fötalem Kälberserum (FCS) war es ein Ziel dieser Arbeit, UCMSC in komplett Serum- und Xeno-freiem Medium zu kultivieren, zu expandieren und auf ihre phänotypischen und funktionellen Fähigkeiten zu untersuchen. Damit sollte die Grundlage für einen klinischen Einsatz der UCMSC geschaffen werden. Die Kultivierung der UCMSC unter diesen GMP (*good manufacturing practice*)-konformen Bedingungen erwies sich als optimal für die Expansion und Differenzierung der UCMSC. Dabei wurde gegenüber den herkömmlichen Kulturbedingungen keine Veränderung der Morphologie oder der spezifischen Markerexpression der Zellen festgestellt. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass die immuninhibierende Wirkung von UCMSC auf die Proliferation von CD4+ T-Zellen in einer allogenen gemischten Lymphozytenreaktion (MLR) im GMP-konformen Medium deutlich stärker als in FCS-haltigem Standardmedium war. Im Hinblick auf den Wirkmechanismus der MLR-Inhibition haben Transwell-Experimente gezeigt, dass dieser Effekt nicht Zell-Zell-Kontakt abhängig war. Als entscheidender löslicher Faktor der immunsupprimierenden Wirkung von UCMSC konnte Prostaglandin E₂ (PGE₂) durch Einsatz eines spezifischen PGE₂-Syntheseinhibitors identifiziert werden. Aufgrund dieser immunmodulierenden Fähigkeiten wurden UCMSC bezüglich eines möglichen Einsatzes als Therapeutikum in der Transplantationsmedizin untersucht, im speziellen als Schutz für vaskuläre Endothelzellen gegen allogene immunologische Effektorzellen. In der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Eißner wurden in Vorarbeiten interessanterweise Endothel-spezifische zytotoxische CD8+ T-Zellen (CTL) identifiziert, die durch die Ko-Inkubation mit CD4+/CD25+/FoxP3+ regulatorischen T-Zellen (Treg-Zellen) in ungewöhnlicher Weise in ihrer lytischen Aktivität gegenüber vaskulären Endothelzellen verstärkt wurden. In fortführenden Untersuchungen wurde in der vorliegenden Arbeit eine Endothel-spezifische Subpopulation mit dem Phänotyp CD8+/CD28-/CD57+ als verantwortlich für diese erhöhte lytische Aktivität identifiziert. In Transwell-Experimenten wurde festgestellt, dass die allogene

Lyse und die Verstärkung derselben durch Treg-Zellen direkten Zell-Zell-Kontakt zwischen den CTL und den endothelialen Zielzellen bzw. zwischen CTL und Treg-Zellen erfordern. Alle Daten zusammen zeigen, dass Treg-Zellen nicht nur positive Eigenschaften besitzen und dass im Hinblick auf den klinischen Einsatz der Treg-Zellen ein zusätzlicher Schutz des Endothels, z.B. durch die Zugabe von UCMSC, nötig werden könnte. In ersten Versuchen konnte bereits die schützende Wirkung von UCMSC auf vaskuläre Endothelzellen nachgewiesen werden. Eine weitere pharmakologische Möglichkeit das vaskuläre Endothel zu schützen wäre der Einsatz des DNA-basierenden Medikaments Defibrotide (DF). Eine Kombination aus der Behandlung mit DF und UCMSC bzw. Treg-Zellen könnte ein wichtiger Schritt zur Verbesserung der Endothelintegrität bei adversen Alloreaktionen sein. Differenzierungsexperimente haben gezeigt, dass UCMSC zudem die Grundlage zur Erzeugung von Patienten-spezifischen Endothel-ähnlichen Zellen (eUCMSC) bieten. Diese wiederum könnten in einem *post-transplant in vitro monitoring* Endothel-spezifischer Alloreaktionen zum Einsatz kommen, was später eine Risiko-adaptierte individualisierte Prophylaxe dieser Alloreaktionen ermöglichen würde.

2 Einleitung

Das Endothel stellt neben der Haut und dem Darm eines der größeren Organe des Menschen dar und bezeichnet die innersten Zellen, die die Lymph- und Blutgefäße auskleiden (siehe Abbildung 1). Das Endothel besitzt eine Vielzahl von Aufgaben. Eine der wichtigsten Rollen spielt das Endothel als eine physikalische Barriere und der damit verbundenen Regulation des Stoffaustausches zwischen Gewebe und Blut. Bei der Angiogenese bilden Endothelzellen durch Aussprossung aus dem bestehenden Kapillargewebe neue Blutgefäße aus, u.a. ein entscheidender Prozess bei der Wundheilung^[1]. Sie sind ebenfalls an der Hemmung bzw. Aktivierung von Gerinnungsvorgängen beteiligt. In diesem Zusammenhang spielt auch der von Willebrand Faktor (vWF, Faktor VIII verwandtes Antigen) eine wichtige Rolle. Der vWF ist ein Träger- und Schutzprotein des Gerinnungsfaktor VIII und wird in endothelspezifischen Weibel-Palade-Körperchen gespeichert. Bei einer vaskulären Verletzung kommt es zur Freisetzung des vWF. Dieser kann sowohl an der geschädigten Gefäßwand als auch an den Blutplättchen binden und ermöglicht dadurch die Thrombozytenaggregation an der geschädigten Stelle^[2].

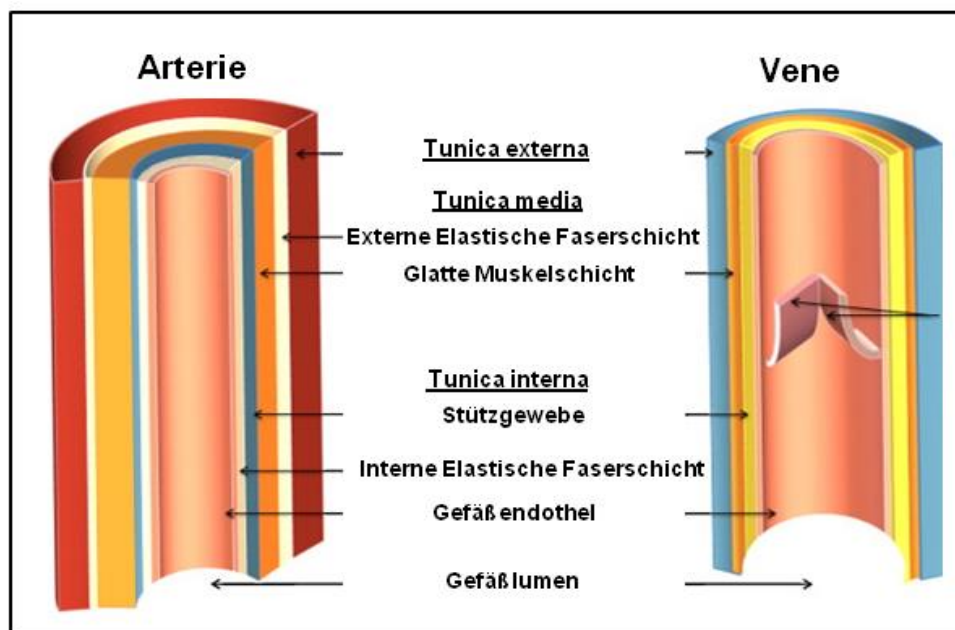


Abbildung 1: Darstellung des Aufbaus von Arterien und Venen. Die Endothelzellen stellen die innerste Schicht dar, die alle Gefäße auskleiden.

(Quelle: modifiziert nach Venkatraman et al., 2008^[3])

Eine weitere wichtige Funktion übernimmt das Endothel bei den immunologischen Prozessen der akuten und chronischen Entzündungsvorgänge. Bei einer Infektion kommt es durch die Aktivierung des Endothels zur Expression von Adhäsionsmolekülen an der Zelloberfläche und ermöglicht so die Bindung von Leukozyten an das Endothel und anschließend deren Transmigration ins betroffene Gewebe^[4].

Endothelpathologie in der Transplantationsmedizin

Die Aktivierung und Schädigung des vaskulären Endothels stellt den zentralen Mechanismus bei der Ausbildung von klinischen Komplikationen nach einer Transplantation dar. Bei Komplikationen nach einer allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation (SZT), greifen die Immunzellen des Transplantats den Empfängerorganismus an. In diesem Fall kommt es zu der sogenannten *Graft-versus-Host-Reaktion* (GvHD, *Graft-versus-Host-Disease*) ^[5]. Eine allogene Transplantation ist oft die letzte Therapiemöglichkeit bei Organerkrankungen im Endstadium. Allerdings sind allogene Organe aufgrund des massiven Spendermangels nur begrenzt verfügbar. So standen Ende 2011 in Deutschland z.B. 992 Personen auf der Warteliste für ein Spenderherz. Transplantiert wurden im Jahr 2012 in Deutschland jedoch insgesamt nur 346 Herzen (Quelle: Eurotransplant Statistik). Ein erfolgreich transplantiertes Herz kann über Jahrzehnte hinweg funktionstüchtig bleiben. Hierzu müssen die Patienten allerdings lebenslang immunsuppressive Medikamente einnehmen, welche das Spenderorgan vor körpereigenen Abwehrreaktionen schützt. Das Hauptproblem von Herztransplantationen im Besonderen bzw. soliden Organtransplantationen im Allgemeinen besteht darin, dass es zu Reperfusionsschäden sowie Abstoßungsreaktionen kommen kann. Bei den Abstoßungsreaktionen greift der Empfängerorganismus das Transplantat an. Man unterscheidet zwischen der hyperakuten, akuten und chronischen Abstoßung. Die hyperakute Transplantationsabstoßung kann bereits nach einigen Minuten bzw. Stunden nach der Wiederherstellung des Blutflusses auftreten. Bei einer akuten Abstoßungsreaktion treten die Komplikationen innerhalb von Tagen oder Wochen nach der Transplantation auf. Wird das Transplantat nach Monaten oder Jahren abgestoßen, so handelt es sich um die chronische Abstoßung ^[6,7].

Sämtlichen Transplantationsdisziplinen ist gemeinsam, dass das vaskuläre Endothel die primäre Zielstruktur transplantationsassoziiierter Komplikationen darstellt. Die Dysintegration des Endothels ist zeitlich sogar vor dem für die jeweilige Organdysfunktion verantwortlichen Epithelschaden angesiedelt ^[8].

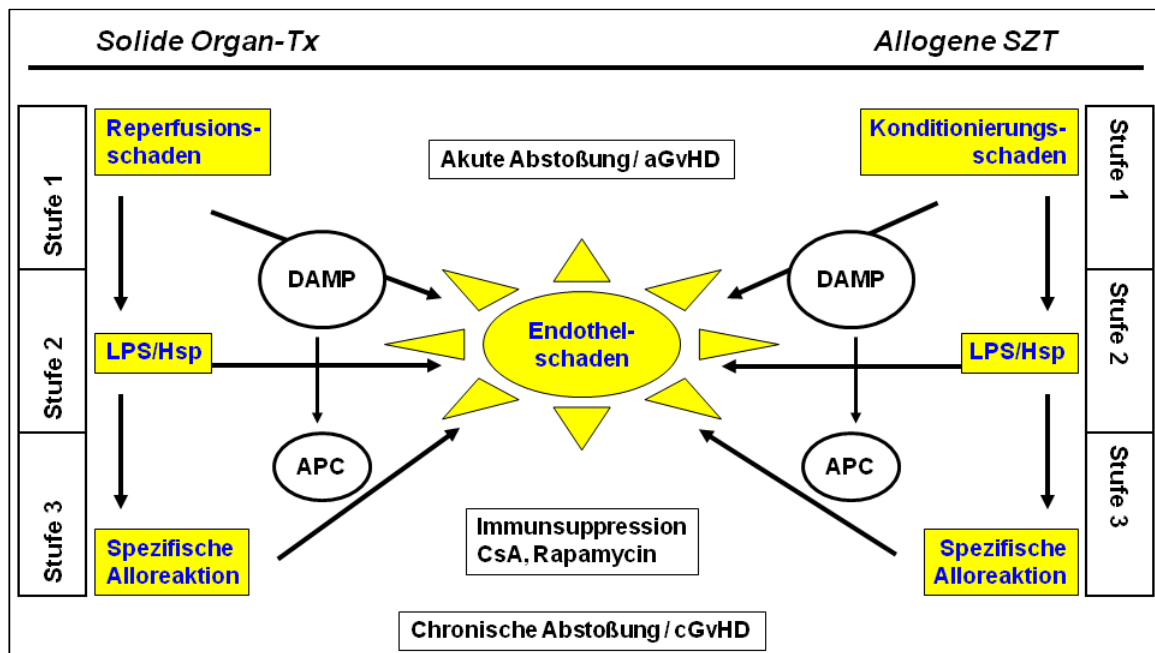


Abbildung 2: Die Endothelpathologie in der Transplantatsmedizin läuft für die verschiedenen Disziplinen vergleichbar in einem 3-Stufen-Prozess ab. Durch Reperfusion bzw. Konditionierung wird das Endothel geschädigt (Stufe 1). Dieser Schaden wird z.B. durch bakterielle Endotoxine (LPS, Lipopolysaccharide), die durch die geschädigte Darm-Mukosa in das Gefäßsystem translozieren und durch Stressproteine (Hsp, *Heat Shock Protein*) noch verstärkt (Stufe 2). Die dadurch entstehenden inflammatorischen Mediatoren aktivieren ein Muster von Schadenssignalen (DAMP, *Damage-associated molecular pattern molecules*), die ihrerseits Endothelzellen zu Antigen-präsentierenden Zellen (APC) und damit zu Zielzellen für spezifische alloreaktive Effektorzellen machen (Stufe 3). Tx: Transplantation; SZT: Stammzelltransplantation; a/cGvHD: akute/chronische *Graft-versus-Host-Disease*; CsA: Cyclosporin A (Quelle: G. Eißner, 2011)

Der Schaden am Endothel nach allogener Transplantation läuft in einem 3-Stufen-Prozess ab (siehe Abbildung 2) ^[5], der auch die Konditionierung (Ganzkörperbestrahlung und/oder Chemotherapie) vor einer Stammzell- ^[8] bzw. die postischämische Reperfusion vor der Organtransplantation umfasst (Stufe 1). Somit entsteht bereits vor der eigentlichen Transplantation eine Beeinträchtigung der Blut-Gewebe-Barriere, welche wahrscheinlich eine Kaskade von inflammatorischen Komplikationen in Gang setzt, die zum letztendlichen Funktionsverlust des Organs führt. Unter anderem können endogene Bakterien durch die geschädigte Darm-Mukosa translozieren und systemische Endotoxämien auslösen. Dadurch werden der Schaden und die Aktivierungsvorgänge am Endothel verstärkt (Stufe 2). Des Weiteren kommt es zur lokalen Ausschüttung von Entzündungsmediatoren, zur Interaktion des Endothels mit zirkulierenden Immunzellen und schließlich zur Induktion spezifischer Allo-Reaktionen, die letztendlich zur Abstoßung des Transplantats führen (Stufe 3).

Die adjuvante Immuntherapie ist eine Behandlungsform, die bereits erfolgreich bei allogenen Transplantationen eingesetzt wird. Studien haben gezeigt, dass regulatorische T-Zellen (Treg-Zellen) recht vielversprechend zur Toleranzinduktion sind, z.B. zur Behandlung der akuten GvHD nach allogener Stammzelltransplantation ^[9,10,11]. Ebenfalls für den potentiellen Einsatz

in der adjuvanten Immuntherapie zur Toleranzinduktion nach Allotransplantation werden mesenchymale Stammzellen (MSC) diskutiert ^[12].

Stammzellen

Eine Eigenschaft von Stammzellen ist es, in unterschiedliche Zelltypen differenzieren zu können. Sie sind auf dem Gebiet der Transplantationsmedizin und dem *Tissue Engineering* (künstlichen Herstellung von Ersatzgewebe zur Wiederherstellung der Organfunktion) von zentraler Bedeutung. Ein wesentliches Kennzeichen von Stammzellen ist dabei die Selbsterneuerung sowie die Generierung von Tochterzellen mit identischen und differenzierten Eigenschaften. Stammzellen lassen sich allgemein durch ihre Differenzierungsfähigkeit in verschiedene Untergruppen einteilen ^[13]. Aus totipotenten Zellen entwickelt sich ein kompletter Organismus, diese umfassen sowohl embryonale als auch extraembryonale Zellen. Die ontogenetisch frühesten Zellen sind die pluripotenten embryonalen Stammzellen. In der weiteren Entwicklung können sich diese Zellen in nahezu jede Körperzelle umwandeln, entsprechend ihrem Ursprung aus den drei Keimblättern Entoderm, Ektoderm und Mesoderm. Davon zu unterscheiden sind die adulten Stammzellen, wie z.B. die hämatopoetischen und mesenchymalen Stammzellen, die im Organismus nach der Geburt vorkommen. Diese multipotenten Zellen sind ebenfalls undifferenzierte und nicht spezialisierte Zellen, sie können aber nicht in jede Körperzelle differenzieren sondern sich einzig zu den entsprechenden Zelltypen mesodermalen Ursprungs verwandeln. Eine oligopotente Vorläuferzelle besitzt die Fähigkeit, nur in bestimmte Zelltypen innerhalb eines Gewebetyps zu differenzieren. Hingegen kann eine unipotente Zelle nur einen einzigen Zelltyp hervorbringen.

Mesenchymale Stammzellen

MSC sind adhärente, Fibroblasten-ähnliche Zellen, die sich in Adipozyten, Chondrozyten und Osteozyten (siehe Abbildung 3) sowie in Endothelzellen differenzieren lassen ^[14,15]. Zur Identifikation von MSC gibt es bisher keinen spezifischen Marker, aus diesem Grund erfolgt die phänotypische Charakterisierung über die Expression von Oberflächenmarkern wie u.a. CD73, CD90 und CD105, sowie durch die Abwesenheit hämatopoetischer Marker wie CD31, CD34 und CD45 ^[16,17,18]. Ihre geringe Immunogenität zeigt sich in der grundsätzlich fehlenden Expression von MHC-Klasse-II- (z.B. HLA-DR) und ko-stimulatorischen Molekülen (z.B. CD80/86). MSC können aus verschiedenen Quellen gewonnen werden, wie z.B. aus Knochenmark oder Fettgewebe. MSC können aber auch ohne chirurgischen Eingriff aus dem perivaskulären und intervaskulären Nabelschnurgewebe, der sogenannten Wharton'schen Sulze (in der vorliegenden Arbeit kollektiv unter *umbilical cord tissue derived* MSC (UCMSC) zusammen gefasst) isoliert werden ^[19]. Die Verwendung von UCMSC ist

darüber hinaus gegenüber embryonalen Stammzellen ethisch unbedenklich ^[19]. Im Hinblick auf einen klinischen Einsatz bieten MSC den Vorteil, dass sie autolog eingesetzt werden können und somit im Allgemeinen keine Immunsuppression erfolgen muss. Nachteilig ist die im Gegensatz zu den embryonalen Stammzellen verminderte Telomeraseaktivität, die dazu führt, dass die adulten Stammzellen nur begrenzt expandiert werden können. In dieser Hinsicht weisen UCMSC im Gegensatz zu adulten MSC aus dem Knochenmark (BMMSC, *bone marrow derived MSC*) auch nach mehreren Einfrier-/Auftauzyklen ein wesentlich höheres Proliferations- und Differenzierungspotenzial (CFU-F, *colony forming units – fibroblasts*) auf ^[20]. Zudem zeigen sie durch geringere MHC-Klasse-I-Expression und eine niedrigere Sensitivität gegenüber inflammatorischen Stimuli mehr Tolerogenität ^[20,21,22].

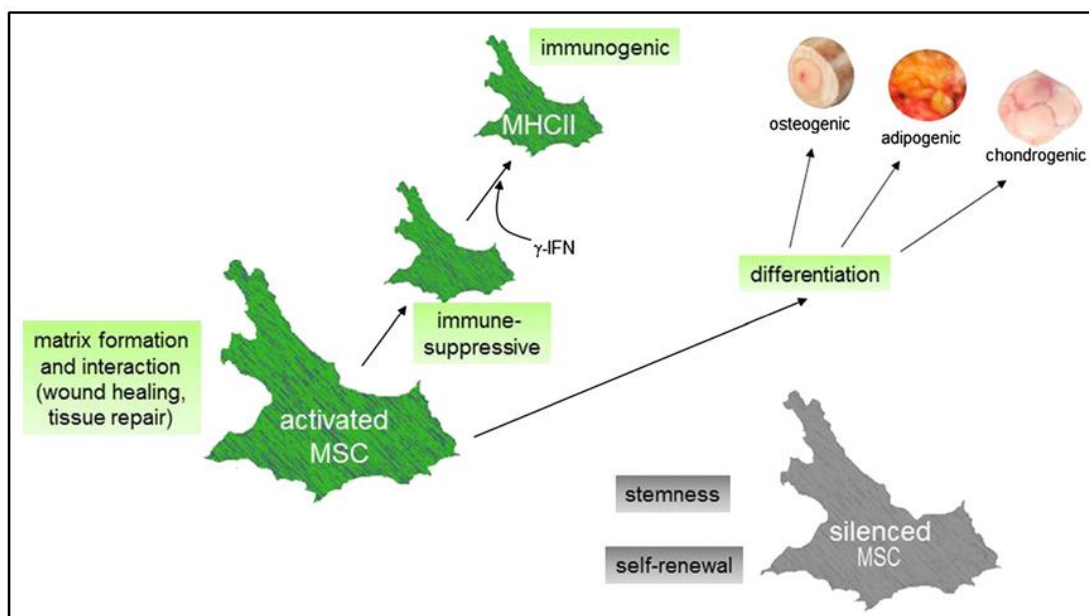


Abbildung 3: Funktionen mesenchymaler Stammzellen. MSC besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung. MSC können identische Tochterzellen generieren oder zu Zellen mesodermalen Ursprungs differenzieren (z.B. Osteozyten, Adipozyten und Chondrozyten). Aktivierte MSC besitzen immunsupprimierende Eigenschaften. Durch proinflammatorische Faktoren (z.B. IFN- γ) exprimieren MSC verstärkt MHC-Klasse-II-Moleküle.

(Quelle: modifiziert nach Hass and Otte ^[23])

Mit ihren immunsuppressiven Eigenschaften ^[24,25] gelten UCMSC daher neben adulten BMMSC und den Treg-Zellen als ein vielversprechendes Therapeutikum zur Toleranzinduktion in der Transplantationsmedizin.

Regulatorische T-Lymphozyten

CD4⁺/CD25⁺ Treg-Zellen ^[26] repräsentieren ca. 5-10 % der gesamten CD4⁺ T-Lymphozyten Population bei gesunden Menschen. Treg-Zellen kontrollieren physiologischerweise die Immunantworten, indem sie die Proliferation und Effektorfunktion von autoreaktiven T-Zellen verhindern ^[26,27]. Es wurden einige Marker zur Identifizierung von Treg-Zellen beschrieben,

wie z.B. der Transkriptionsfaktor FoxP3 (*forkhead box P3*), GTR (*glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related gene*), CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*) und CD62L (L-Selektin, Zell-Adhäsionsmolekül) ^[27]. FoxP3 ist ein essentieller Transkriptionsfaktor bei der Entwicklung und der späteren immunsuppressiven Funktion von Treg-Zellen ^[28]. Treg-Zellen können die Aktivierung konventioneller FoxP3- T-Zellen (Tconv Zellen) verhindern oder auch die Antigen-präsentierende Funktion der Zielzellen negativ beeinflussen. Fehlregulationen in der Funktion oder der Anzahl an Treg-Zellen können zu schweren Autoimmunkrankheiten und inflammatorischen Prozessen führen ^[29]. Allgemein kann man zwischen zwei Arten von Treg-Zellen unterscheiden, den natürlichen und den induzierten Treg-Zellen (siehe Abbildung 4).

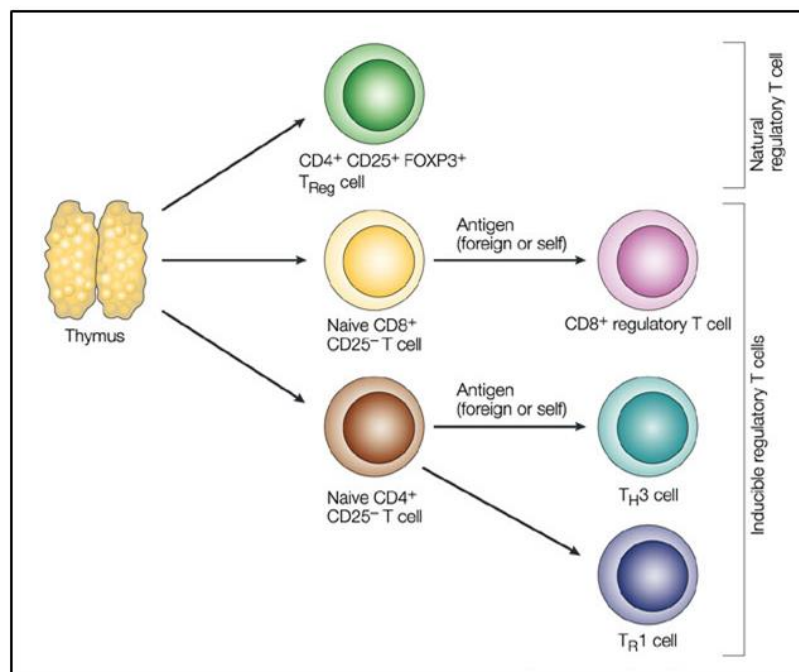


Abbildung 4: Natürliche und induzierte regulatorische T-Zellen. Natürliche Treg-Zellen entwickeln sich bereits im Thymus und zeichnen sich durch die Expression der Marker CD25 und FoxP3 aus. Induzierte Treg-Zellen werden aus naiven CD4+/CD25- T-Zellen in der Peripherie generiert (T_H3 und T_R1). Aus CD8+/CD25- T-Zellen können ebenfalls supprimierende Treg-Zellen entstehen. (Quelle: Mills, 2004)

Natürliche Treg-Zellen werden bereits im Thymus durch körpereigene Antigene geprägt und zeichnen sich durch die konstitutive Expression von CD25 und FoxP3 aus. Die Generierung von adaptiven Treg-Zellen (T_H3 und T_R1) wird erst in der Peripherie durch Gewebs- oder Fremdanigene stimuliert, deren Vorläufer naive CD4+/CD25- darstellen. Aus CD8+/CD25- Vorläufer-T-Zellen können sich auch CD8+ Treg-Zellen entwickeln ^[30].

CD4+/CD25+/FoxP3+ Treg-Zellen gelten als aussichtsreiche Kandidaten bei der Toleranzentwicklung in der soliden und allogenen Stammzelltransplantation ^[31]. Bislang ist allerdings noch nicht untersucht worden, welchen Einfluss Treg-Zellen auf die Wirkung von zytotoxischen CD8+ T-Lymphozyten gegenüber vaskulären Endothelzellen haben.

3 Zielsetzung dieser Arbeit

Ein Hauptziel der allogenen Transplantation von Zellen und Organen ist die völlige Wiederherstellung eines funktionierenden Immunsystems bzw. einer durch chronische Erkrankung verloren gegangenen Organfunktion. Dabei steht die Induktion immunologischer Toleranz unter Verzicht auf die lebenslange Gabe von toxischen Immunsuppressiva im Vordergrund. Ein vielverfolgter Ansatz ist die adjuvante Immuntherapie mit regulatorischen T-Zellen. Über die Nebenwirkung derartiger Zelltherapien im Hinblick auf spezifische Reaktionen am vaskulären Endothel ist sehr wenig bekannt, obwohl das Endothel das primäre Zielorgan transplantationsassoziiierter Komplikationen darstellt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, CD4⁺/CD25⁺/FoxP3⁺ regulatorische T-Zellen und humane mesenchymale Stammzellen aus dem Nabelschnurgewebe (UCMSC) auf die Beeinflussung Endothel-spezifischer zellulärer Alloreaktionen zu untersuchen.

4 Material

4.1 Zellen

4.1.1 Primäre Zellen

Bezeichnung	Typ
UCMSC * ¹	Mesenchymale Stammzellen aus dem Nabelschnurgewebe (<i>u</i> mbilical <i>c</i> ord <i>t</i> issue <i>d</i> erived <i>m</i> esenchymal <i>s</i> tem <i>c</i> ells)
HUVEC * ¹	Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (<i>h</i> uman <i>u</i> mbilical <i>v</i> ein <i>e</i> ndothelial <i>c</i> ells)
PBMC * ²	Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (<i>p</i> eripheral <i>b</i> lood <i>m</i> ononuclear <i>c</i> ells)

*¹ Die UCMSC und HUVEC wurden nach Protokoll (siehe Abschnitt 5.1.1 - 5.1.2) aus dem Nabelschnurgewebe bzw. aus der Nabelschnurvene isoliert. Die UCMSC umfassen sowohl die WJC (*W*harton's *J*elly *C*ells) als auch die PVSC (*P*erivascular *S*tem *C*ells). Die Nabelschnurpräparate wurden mit einer entsprechenden Einverständniserklärung der Mutter an einer hiesigen Geburtsklinik (Wolfart Klinik, Gräfelting) gesammelt und in komplett und irreversibel anonymisierter Form dem Labor zur Verfügung gestellt.

*² Die PBMC wurden nach Protokoll (siehe Abschnitt 5.1.3) isoliert und stammten von Leukaphoresen von freiwilligen Spenden, die im Institut für Klinische Chemie und Transfusionsmedizin der Universität Regensburg durchgeführt und in komplett und irreversibel anonymisierter Form an unser Labor weitergegeben wurden.

4.1.2 Zelllinien

Bezeichnung	Typ
HMEC (CDC/EU.HMEC-1) * ³	Humane Mikrovaskuläre Endothelzelllinie (<i>h</i> uman <i>m</i> icrovascular <i>e</i> ndothelial <i>c</i> ell <i>l</i> ine, SV40-largeT-transformiert)
K562 * ⁴	Humane chronisch-myeloische Leukämiezelllinie

*³ Freundlicherweise vom "Centers for Disease Control and Prevention" (Atlanta, Georgia, USA) mittels eines Material-Transfer-Übereinkommens zur Verfügung gestellt ^[32].

*⁴ Die K562 wurden von der AG Prof. Dr. G. Multhoff (Klinikum Universität Regensburg) zur Verfügung gestellt.

4.2 Medien

4.2.1 Kulturmedien

Zellen	Bezeichnung	Zusammensetzung
UCMSC	Growth Medium #1 (GM#1) nach Seshareddy et al. ^[19]	56% DMEM low glucose +100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin +2 mM L-Glutamin +1x Insulin-Transferrin-Selenium +0,15 mg/ml ALBU-Max 1 (Gibco, Karlsruhe, Deutschland) +37% MCDB 201+1 nM Dexamethason +100 µM L-Ascorbinsäure-2-Phosphat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) +2% FCS (PAA, Pasching, Österreich) +10 ng/ml humaner Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) +10 ng/ml humaner Thrombozyten-Wachstumsfaktor (PDGF) (R&D, Wiesbaden, Deutschland)
	StemPro MSC SFM® (SP+2%HS; Gibco, Karlsruhe, Deutschland)	+2% Pool-Humanserum (GMP-zertifiziert, Zentrum für Klinische Transfusionsmedizin (ZKT), Tübingen, Deutschland)
	Mesencult XF® (MC; Stemcell Technologies, Grenoble, Frankreich)	+2 mM L-Glutamin (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)
HUVEC	Isolationsmedium	Medium 199 (Gibco, Karlsruhe, Deutschland) +10% FCS (PAA, Pasching, Österreich)
	Kulturmedium	<i>Endothelial Cell Growth Medium</i> MV (Promocell, Heidelberg, Deutschland)
PBMC und K562	Kulturmedium (Standardmedium)	RPMI 1640 +10% hitzeinaktiviertem FCS (PAA, Pasching, Österreich) +100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin +2 mM L-Glutamin (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)
CD4+ und CD8+ T-Zellen	IL-2-Medium	RPMI-Standardmedium +100 U/ml Interleukin 2 (Novartis, Nürnberg, Deutschland)
HMEC	Endothelmedium	MCDB 131 +100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin +8 mM L-Glutamin (Gibco, Karlsruhe,

		Deutschland) +15% hitzeinaktiviertem FCS (PAA, Pasching, Österreich) +1 µg/ml Hydrocortison (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) +10 ng/ml Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF; BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland)
CD4+/CD25+ regulatorische T-Zellen	Treg Medium	RPMI 1640 (PAA, Pasching, Österreich) +10% Humanserum AB (Lonza AG, Köln, Deutschland) +100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin +2 mM L-Glutamin +50 µM 2-Mercaptoethanol +1 mM Sodumpyruvat +1x MEM NEAA (Gibco, Karlsruhe, Deutschland) +300 U/ml IL-2 (Novartis, Nürnberg, Deutschland) +100 µM Rapamycin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland)

4.2.2 Einfriermedium

Das Einfriermedium besteht zu 70% aus dem jeweiligen Kulturmedium, 20% Serum (Pool-Humanserum oder FCS) und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland).

4.2.3 Differenzierungsmedien

Differenzierung	Medium
Adipozyten	DMEM <i>low glucose</i> +0,1x Insulin-Transferrin-Selenium (Gibco, Karlsruhe, Deutschland) +10% FCS (PAA, Pasching, Österreich) +0,1 µM Dexamethason +0,5 mM 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) +1 µM Ascorbinsäure-1-Phosphat (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) +10 µM Indomethacin (Cayman Chemicals, Hamburg, Deutschland)
Osteozyten	DMEM <i>low glucose</i> (Gibco, Karlsruhe, Deutschland) +10% FCS (PAA, Pasching, Österreich) +0,1 µM Dexamethason +0,2 µM Ascorbinsäure +10 mM β-Glycerolphosphat (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland)
eUCMSC	Medium 199 (Gibco, Karlsruhe, Deutschland) +1% FCS (PAA, Pasching, Österreich) +50 ng/ml humaner vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF) +10 ng/ml humaner Fibroblasten Wachstumsfaktor (β-FGF; Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland)

4.3 Antikörper

4.3.1 Direkte Färbung

Bezeichnung	Isotyp	Fluoreszenz-Markierung	Hersteller
CD31	Maus IgG1	FITC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CD34	Maus IgG1	APC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CD45	Maus IgG1	APC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CD73	Maus IgG1	APC	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
CD90	Maus IgG1	APC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CD105	Maus IgG1	APC	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
HLA-DR	Maus IgG2a	APC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

4.3.2 Indirekte Färbung

Primäre Antikörper

Bezeichnung	Isotyp	Hersteller
vWF	Kaninchen IgG	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
W6/32	Maus IgG1	Hybridomaüberstand

Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Fluoreszenz-Markierung	Hersteller
Polyclonal Goat Anti-Rabbit IgG	FITC	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Polyclonal Goat Anti-Mouse IgG	FITC	Dako, Eching, Deutschland

4.4 Zytokine

Bezeichnung	Hersteller
Rekombinantes humanes IL-2	Novartis, Nürnberg, Deutschland

4.5 Kits und spezielle Reagenzien

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
CD4+ T Cell Isolation Kit II, human	Isolierung von CD4+ T-Helferzellen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD8+ T Cell Isolation Kit, human	Isolierung von CD8+ zytotoxischen T-Zellen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD28 MicroBead Kit, human	Isolierung von CD8+/CD28- und CD8+/CD28+ zytotoxischen T-Zellen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD57 MicroBead Kit, human	Isolierung von CD8+/CD57+ zytotoxischen T-Zellen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD4+/CD25+ Regulatory T Cell Isolation Kit, human	Isolierung von regulatorischen T-Zellen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Dynabeads® Human T-Activator CD3/CD28	Expansion von regulatorischen T-Zellen	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
BD-Simultest	Überprüfung der Zellisolierungen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FoxP3	Nachweis der intrazellulären FoxP3-Expression	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
Oilred O (0,5 g /100 ml 99%-igen Isopropanol)	Nachweis von Adipozyten	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Alizarinrot S (0,25 g /25 ml H ₂ O +250 µl 25%-igen Ammoniak)	Nachweis von Osteozyten	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Kollagenase Typ I	Isolierung von HUVEC und UCMSC	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Hyaluronidase Grade I	Isolierung von UCMSC	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
PFA (Paraformaldehyd)	Fixierung von Zellen	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Saponin	Permeabilisierung von Zellen	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
CFSE	Intrazelluläre Färbung von CD4+ T-Zellen	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Silibinin	Mitose-Inaktivierung von Endothelzellen	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland

DIOC(18)3	Membranfärbung von Endothelzellen	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
-----------	-----------------------------------	---

4.6 Allgemeine Puffer und Lösungen

PBS	PAA, Pasching, Österreich
H ₂ O	ultrareines Wasser: Entmineralisiertes Wasser wird durch das Wasseraufbereitungssystem MilliQ 185 plus (Millipore) gereinigt
Transportlösung für Nabelschnüre	PBS mit 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)
Ficoll	PAA, Pasching, Österreich
MACS-Puffer	PBS + 10 % BSA + 0,4 % 0,5 M EDTA-Lösung (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
FACS-Flow	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

4.7 Weitere Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
T25 (25 cm ²) Primaria Zellkulturflaschen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
T25 (25 cm ²)/T75 (75 cm ²)/T150 (150 cm ²) Zellkulturflaschen	Corning, New York, USA
6-/24-/96-Well-Zellkulturplatten	Corning, New York, USA
Transwell-Einsätze (6-/24-Well)	Corning, New York, USA
15/50 ml Zentrifugenröhrchen	Corning, New York, USA
15 µ-Slide 8 well, ibiTreat	ibidi, Martinsried, Deutschland
15 µ-Slide Angiogenesis	ibidi, Martinsried, Deutschland
5 ml Rundbodenröhrchen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Aspirationspipetten	Omnilab
2/5/10/20/50 ml Pipetten	Corning, New York, USA
0,5/1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
2 ml Kryoröhrchen	Corning, New York, USA

4.8 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank / Inkubator	HERA cell 240	Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland
Durchflusszytometer	FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
ELISA Reader	MULTISKAN EX	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Mikroskop	Axiovert 40C	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
	Axiostar plus	
	Axio Observer	
Zell-Separator	Quadro MACS™ Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
	EasySep® Magnet	Stemcell Technologies, Grenoble, Frankreich
Zentrifugen	Rotina 420R	Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
	Mikro 200R	

5 Methoden

5.1 Isolierung von Zellen

5.1.1 Isolierung von Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC)

Die Nabelschnüre wurden direkt nach der Geburt in einer Transportlösung mit 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bis zur Endothel- und Stammzellisolierung für etwa 6-72 Stunden bei 4°C aufbewahrt. Die Nabelschnüre wurden zunächst mit PBS und sterilen Kompressen äußerlich von Blutresten befreit. An beiden Enden wurde ca. 1 cm entfernt, um eine Kontamination zu vermeiden. Um die Vene spülen zu können, wurde an den Enden ein Schlauchstecker mit einem ca. 5 cm langen Schlauchstück in die Vene eingeführt und mit einem Kabelbinder fixiert. Zur Reinigung wurde die Vene mit je 20 ml PBS ggf. mehrfach gespült. Zur Isolierung der HUVEC wurde die Vene anschließend mit einer Kollagenase-Typ I-Lösung (1 mg/ml in PBS) unter Hinzunahme chirurgischer Klemmscheren aufgefüllt. Die Nabelschnur wurde für maximal 5 Minuten in PBS in einem sterilen Becherglas im Wasserbad bei 37°C inkubiert, um eine Verunreinigung durch Fibroblasten zu verhindern. Die Enzymlösung mit den abgelösten HUVEC wurde in einem 50-ml-Zentrifugenröhrchen gesammelt. Um die Endothelzellen möglichst quantitativ zu gewinnen, wurde die Vene noch zusätzlich mit 20 ml PBS gespült und die Lösung in demselben Röhrchen aufgefangen. Die Zell-Kollagenase-Suspension wurde anschließend bei 210 g für 5 Minuten bei RT ohne Bremse abzentrifugiert. Die Zellen wurden dann nach einem weiteren Waschschrift im Isolationsmedium ausgesät. Je nach Ausbeute wurde die Zellsuspension auf eine entsprechende Anzahl an T25 Primaria Zellkulturflaschen (10^4 Zellen/cm²) aufgeteilt. Nach 24 Stunden wurde das Medium durch Endothelmedium ersetzt.

5.1.2 Isolierung von mesenchymalen Stammzellen aus dem Nabelschnur-gewebe (UCMSC)

Die mesenchymalen Stammzellen wurden sowohl aus der Wharton'schen Sulze wie auch aus dem perivaskulären Bereich der Arterien isoliert (siehe Abbildung 5).

Die Isolierung der UCMSC erfolgte nach Protokoll von Seshareddy et al. ^[19]. Für die Verarbeitung der Nabelschnur wurde diese in 2-3 cm große Stücke zerteilt. Zur vereinfachten Präparation wurden die Stücke vor der Bearbeitung mit einer sterilen Komresse abgetupft. Die einzelnen Stücke wurden mit einem Skalpell längs aufgeschnitten, die Arterien freigelegt und mit einer Pinzette herausgezupft (siehe Abbildung 6, A-D). Die Lagerung der einzelnen Bestandteile erfolgte immer in frischem PBS.

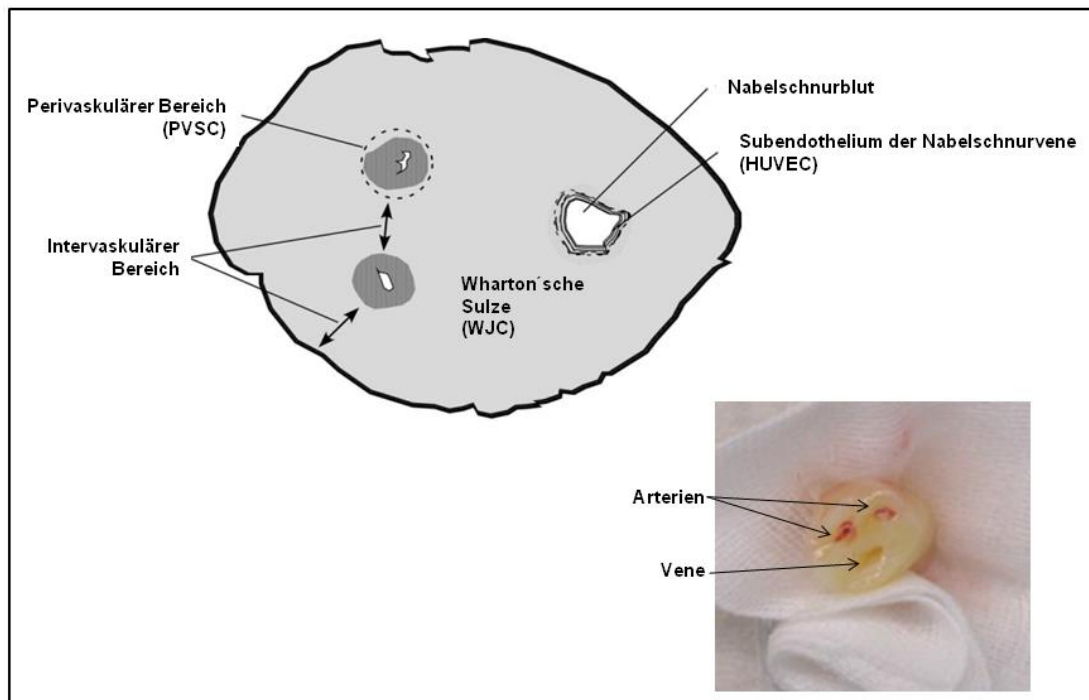


Abbildung 5: Querschnitt einer Nabelschnur (oben: Skizze, modifiziert nach Troyer et. al, 2008 ^[20]; unten: Originalaufnahme, Quelle I. Hartmann); PVSC: Perivaskuläre Stammzellen (*perivascular stem cells*); HUVEC: humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (*human umbilical vein endothelial cells*); WJC: Mesenchymale Stammzellen aus der Wharton'schen Sulze (*Wharton's jelly cells*)

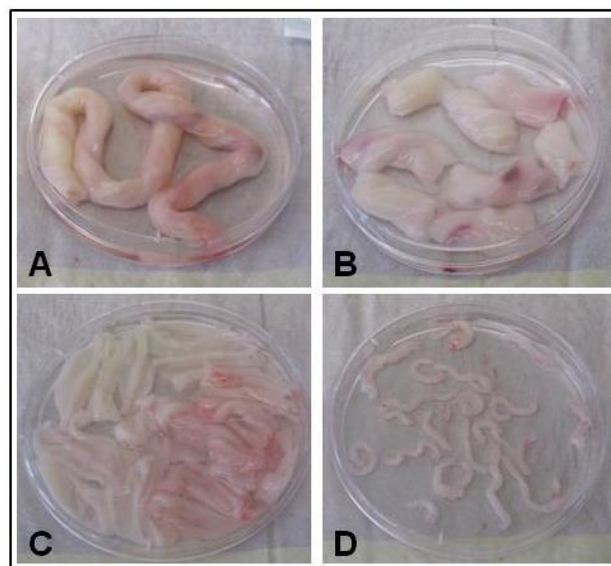


Abbildung 6: Präparation einer Nabelschnur (Quelle I. Hartmann); A: Ganze Nabelschnur nach der äußeren Reinigung; B: Zur weiteren Verarbeitung wurde die Nabelschnur in 2-4 cm große Stücke zerlegt; C: Einzelne Stücke der Wharton'schen Sulze nach dem Entfernen der Arterien; D: Entfernte Arterien mit dem sie umgebenden perivaskulären Bereich

In einem ersten Isolierungsschritt wurde die frei präparierte Wharton'sche Sulze in einem 50-ml-Zentrifugenröhrchen mit einer Enzymlösung, bestehend aus PBS mit 300 U/ml Kollagenase Typ I und 1 mg/ml Hyaluronidase Grade I, für 60 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Stücke durch ein Zellsieb gequetscht. Die gewonnene

Zellsuspension wurde abzentrifugiert (219 g, 5 Minuten bei RT) und in Kulturmedium aufgenommen, während die Nabelschnurstücke in einem zweiten Verdauschnitt in einer 0,1%-igen Trypsin/EDTA-PBS-Lösung bei 37°C im Brutschrank für 30 Minuten inkubiert wurden. Nach diesem 2. Schritt wurde die Sulze nochmals ausgequetscht und die gewonnene Zellsuspension mit der aus dem ersten Schritt vereint und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde im Kulturmedium resuspendiert und die UCMSC in Zellkulturflaschen mit einer Dichte von etwa 10^4 Zellen/cm² ausgesät. Bis zur ersten Passage der UCMSC bei 80-90%-iger Konfluenz wurde das Medium alle 2-3 Tage zur Hälfte erneuert ^[19].

5.1.3 Ficoll Dichtegradienten-Zentrifugation

PBMC aus verschiedenen Apharesepräparaten wurden mittels eines Ficoll-Dichtegradienten isoliert. Zu diesem Zweck wurde das Leukaphareseprodukt 1:2 mit Standardmedium verdünnt. In einem 50-ml-Zentrifugenröhrchen wurden jeweils 15 ml der Ficoll-Lösung (spez. Dichte: 1,077) vorgelegt und mit 30 ml der Zellsuspension sehr vorsichtig überschichtet, um eine Vermischung des Gradienten zu verhindern. Die Zentrifugation erfolgte bei 210 g für 20 Minuten und RT ohne Bremse. Nach der Zentrifugation waren die PBMC deutlich als weißer Ring zwischen dem Blutplasma und dem Ficoll zu erkennen (siehe Abbildung 7), während Erythrozyten und Granulozyten im Pellet zu finden waren. Die Zellen aus dem weißen Ring wurden mit einer 5 ml Pipette vorsichtig abgesaugt und in ein neues 50-ml-Zentrifugenröhrchen mit Standardmedium überführt, mit Standardmedium aufgefüllt. Anschließend erfolgten 3 Waschschrte, bis die PBMC entweder direkt zur Isolierung regulatorischer T-Zell eingesetzt oder mit ca. 30-50 x10⁶ Zellen pro ml kryokonserviert wurden.

5.1.4 Immunmagnetische Bead-Separation

Für die Durchführung der Gemischten Lymphozytenreaktionen und Zytotoxizitätsanalysen (siehe Abschnitt 5.7 und 5.8) und somit auch zur Untersuchung der Eigenschaften von CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen wurden sowohl die CD4+ als auch die CD8+ T-Zellen mittels immunmagnetischer Bead-Separation unter Verwendung der Magnet-Systeme von Miltenyi Biotec von Spender PBMC isoliert.

Allgemein erfolgte die Isolierung über die Markierung der gewünschten Zellsubpopulation (Positivselektion, siehe Abbildung 8) oder über die Markierung aller unerwünschten Subpopulationen (Negativselektion) mit speziellen monoklonalen Antikörpern, welche mit superparamagnetischen Mikropartikeln (Beads, Durchmesser ca. 100 nm) gekoppelt waren. Die Zell-Bead-Suspension wurde auf eine Trennsäule pipettiert, welche in einem starken Magneten verankert war. Die Trennsäule besaß eine Matrix aus Stahlwolle. Alle markierten Zellen blieben in der Säule arretiert, hingegen flossen alle nicht markierten Zellen durch die

Säule durch und wurden in einem 15-ml-Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Die Säule wurde dreimal mit einer MACS®-Pufferlösung durchspült. Bei einer Positivselektion wurde die Säule nach dem Spülen aus dem Magnetfeld genommen und die gewünschten Zellen mit der Pufferlösung aus der Säule eluiert. Die Isolierung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen erfolgte mit speziellen Kits für eine Negativselektion nach den Angaben des Herstellers (Miltenyi Biotec). Regulatorische T-Zellen wurden mit derselben Methode und einem speziellen Kit vom gleichen Hersteller isoliert. In einem ersten Schritt wurden über eine Negativselektion die CD4⁺ T-Zellen separiert. In zweiten Schritt erhielt man die Subpopulation CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen über eine Positivselektion. Um die Reinheit der CD4⁺CD25⁺ Population zu erhöhen wurde die Positivselektion über CD25 wiederholt.

5.2 Kultivierung von primären Zellen und Zelllinien

5.2.1 Zellkultur von adhärenenten Zellen und Suspensionszellen

Die Kultivierung von adhärenenten Zellen und Suspensionszellen erfolgte in Zellkulturflaschen (T25, T75 oder T150 mit 25, 75 oder 150 cm² Fläche) bei 37°C, 5% CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95%. Sämtliche Zentrifugationsschritte wurden, wenn nicht anders angegeben, in der Rotina 420 R-Zentrifuge bei 219 g für adhärenente Zellen und bei 255 g für Suspensionszellen für 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt.

Adhärenente Zellen

Die adhärenent wachsenden Zellen wurden im jeweiligen Kulturmedium (siehe Abschnitt 5.2.1) kultiviert. Zum Passagieren der Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für ca. 1-5 Minuten - abhängig von Zelltyp und Flaschengröße - mit 1-5 ml einer enzymatischen Lösung (0,05% Trypsin/EDTA) bei 37°C inkubiert. Durch kurzes Klopfen gegen die Kulturflasche konnten die Zellen abgelöst werden. Um die enzymatische Reaktion zu stoppen, wurde die entsprechende Menge vom jeweiligen Kulturmedium oder der Kit-zugehörigen Inhibierungslösung dazugegeben. Nach dem Abzentrifugieren wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und je nach Zelltyp etwa 5.000 - 10.000 Zellen pro cm² neu ausgesät.

Suspensionszellen

Die in Suspension wachsenden Zellen (PBMC und K562) wurden in RPMI-Komplett-Medium (siehe Abschnitt 5.2.1) kultiviert. Je nach Zellart enthielt das Medium weitere Faktoren (siehe Abschnitt 5.2.1). Ein Mediumwechsel erfolgte, wenn ein Farbumschlag des Mediums auftrat, ca. alle 2-3 Tage. Durch den Nährstoffverbrauch ändert sich der pH-Wert des Mediums von basisch zu sauer und der Indikatorfarbstoff Phenolrot schlägt zu gelb um. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert und ausgesät.

5.2.2 Kryokonservierung von Zellen

Primäre Zellen bzw. Zelllinien können über längere Zeit hinweg vital eingefroren werden. Hierzu ist ein spezielles Medium erforderlich, das Dimethylsulfoxid (DMSO) enthält. DMSO setzt die Fluidität der Zellmembran herab, wodurch das Eindringen von Eiskristallen in die Zellen und somit deren Schädigung verhindert werden kann. Aufgrund der Toxizität von DMSO bei RT muss das Einfrieren möglichst zügig und auf Eis erfolgen. Die entsprechenden Zellen wurden sedimentiert und mit gekühltem Einfriermedium (siehe Abschnitt 5.2.2) auf eine Konzentration von 1×10^6 bis 5×10^6 Zellen / ml bzw. PBMC mit $30\text{-}50 \times 10^6$ Zellen / ml eingestellt. Hiervon wurden 1 ml Aliquots in sterile Kryoröhrchen überführt und diese sofort bei -80°C in dafür vorgesehenen Boxen eingefroren und nach 24 Stunden in flüssigen Stickstoff (-196°C) umgelagert.

5.2.3 Auftauen von Zellen

Damit die Zellen keinen zusätzlichen Schaden durch das vorhandene DMSO aufgrund eines langsamen Auftauens nahmen, wurden die Zellen sofort im Wasserbad bei 37°C gehalten und die Zellsuspension in ausreichend Kulturmedium überführt und entsprechend zentrifugiert. Der Waschschrift wurde ein weiteres Mal wiederholt und das Zellpellet anschließend in dem entsprechenden Kulturmedium resuspendiert und in Gewebekulturflaschen ausgesät.

5.3 Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen aus dem Nabelschnurgewebe (UCMSC)

Als funktionelle Qualitätskontrolle wurden die Zellen mit verschiedenen Medien und spezifischen Wachstumsfaktoren (siehe Abschnitt 4.2.3) kultiviert und in verschiedene Zellen mesenchymalen Ursprungs differenziert. Getestet wurden die adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung. Zusätzlich wurde die Differenzierungsfähigkeit der UCMSC zu Endothel-ähnlichen Zellen überprüft. Spezielle Färbungen und der Einsatz im Angiogenesetest dienten als Nachweis der erfolgreichen Differenzierung.

5.3.1 OilRedO-Färbung

Bei der Adipozyten-Differenzierung kommt es nach etwa 3 Wochen Inkubation zur Bildung von Fetttropfchen in den differenzierten Zellen. Zur Vorbereitung für die Färbung mit Oilred O wurden die Zellen direkt in der Zellkulturplatte (6-Loch-Platte) einmal mit PBS gewaschen und 10 Minuten mit 4% Paraformaldehyd-PBS-Lösung fixiert. Nach einmaligem Waschen mit H_2O und einer Behandlung mit 60%-igen Isopropanol wurden die Zellen etwa 2 Stunden in der frisch angesetzten Oilred O Färbelösung bei Raumtemperatur inkubiert. Am Vortag

wurden 6 ml der Stammlösung (5 mg/ml) mit 4 ml H₂O gemischt und vor dem Gebrauch filtriert. Nach der Inkubationszeit wurde die Färbelösung abgenommen und die Zellen einmal mit 60%-igen Isopropanol und dreimal mit H₂O gewaschen, bevor die Färbung mikroskopisch beurteilt wurde.

5.3.2 Alizarin Rot-Färbung

Bei der Osteozyten-Differenzierung kommt es zur Kalzifizierung der Zellen. Diese ließen sich nach etwa 3 Wochen Inkubation im Differenzierungsmedium ohne weiteres passagieren und über eine Alizarinrot S-Färbung nachweisen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend für 10 Minuten mit Methanol fixiert. Nach einmaligem Waschen mit H₂O erfolgte die Inkubation in der Alizarinrot S-PBS-Färbelösung (10 mg/ml) für weitere 10 Minuten. Nach dem Abnehmen der Färbelösung wurden deren Reste mit mehrmaligem Waschen mit H₂O entfernt und die Färbung im Mikroskop untersucht.

5.3.3 von Willebrand Faktor Färbung

Zum Nachweis der endothelialen Differenzierung wurde eine von Willebrand Faktor (vWF) Färbung durchgeführt. Am Vortag der Färbung wurden 1×10^4 Zellen pro Well eines speziellen Objektträgers (15 µ-Slide 8-well, ibiTreat, Fa. ibidi) ausgesät. Zunächst erfolgte die Fixierung mit einer Methanol-Aceton-Mischung (1:1) für 2 Minuten bei Raumtemperatur. Nach dem Waschen mit PBS inkubierten die Zellen mit dem primären polyklonalen Antikörper gegen vWF für 45 Minuten bei 37°C im Brutschrank. Nach einem PBS-Waschschritt wurden die Zellen für 30 Minuten bei 37°C mit dem FITC-markierten sekundären Antikörper inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit PBS/10% FCS gewaschen und die Zellkerne mit DAPI (1 µg/ml in PBS), einem in die DNS inter-kalierenden Fluoreszenzfarbstoff, angefärbt. Die Auswertung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop.

5.3.4 Angiogenese

Eine zweite Nachweismethode der endothelialen Differenzierung ist die Tubenbildung in semisolidem MatrigelTM. 10 µl MatrigelTM wurden in einem speziellen Objektträger (15 µ-Slide Angiogenesis) der Fa. ibidi pipettiert und etwa 5×10^3 Zellen in 30 µl Differenzierungsmedium pro Vertiefung hinzugegeben. Die Zellen wurden mehrere Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Tubenbildung wurde stündlich im Mikroskop überprüft und Bilder aufgenommen. Ausgewertet wurden die einzelnen Aufnahmen mit einer speziellen Software (AxioVision von Zeiss).

5.4 Proliferationsanalyse

Die Überprüfung der Proliferationsfähigkeit von UCMSC in den verschiedenen Kulturmedien erfolgte von der ersten bis einschließlich der fünften Passage. Die UCMSC wurden direkt nach der Isolierung in den drei verschiedenen Medien (GM#1, SP+2%HS und MC, siehe Abschnitt 4.2.1) kultiviert. In jeder Passage wurden die Zellen jeweils in einer Dichte von 1×10^4 Zellen/cm² in einer 25-cm²-Zellkulturflasche ausgesät. Die Anzahl und die Vitalität der Zellen wurden in jeder Passage (nach 3 Tagen) mit einer Trypanblau-Färbung und der Zählung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

5.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie mit dem FACS (*fluorescence-activated cell scanner*) ermöglicht eine Identifizierung und Zählung von Zellen anhand ihrer Größe (Vorwärtsstreulicht), ihrer Granularität (Seitwärtsstreulicht) wie auch ihrer intrazellulären und Oberflächenmoleküle. Fluoreszenz-markierte Zellen passieren in einem Flüssigkeitsstrom hydrodynamisch fokussiert nacheinander einen Laserstrahl. Dabei werden die Fluorochrome zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt und zusätzlich streuen die Zellen das auftreffende Licht. Verschiedene fotosensitive Detektoren detektieren das Fluoreszenzlicht spezieller Wellenlängen. Nach einer Verstärkung wird das optische Signal zunächst in elektrische Ströme und schließlich in ein digitales Signal umgewandelt.

5.5.1 Immunfluoreszenzmarkierung von Zelloberflächenproteinen

Für jede Zellpopulation wurde neben der spezifischen Antikörper-Färbung zur Normalisierung eine Negativ- bzw. Isotypkontrolle durchgeführt, bei welcher der primäre Antikörper durch einen unspezifischen Antikörper des gleichen Isotyps ersetzt wurde. Alle Zentrifugationsschritte wurden in der Rotina 420 R bei 4°C und 255 g für fünf Minuten durchgeführt. In einem 5-ml-Rundbodenröhrchen wurden $1-2 \times 10^5$ Zellen zweimal mit 1 ml PBS/10% FCS gewaschen. Die Zellsedimente wurden in 200 µl einer Antikörperlösung (PBS/10% FCS; primärer oder direkt markierter AK) resuspendiert und für 45 Minuten auf bei 4°C inkubiert. Auf die Inkubation folgten zwei Waschschrte mit jeweils 1 ml PBS/10% FCS. Bei nicht-markierten Primärantikörpern erfolgte eine zweite Inkubation (30 Minuten, 4°C) mit 200 µl der sekundären Antikörperlösung und anschließender zweimaliger Waschschrte. Zur Messung wurde pro Röhrchen 200 µl PBS/10% FCS hinzupipettiert. Bei einer vitalen Färbung konnten die Proben bis zur Messung mehrere Stunden bei 4°C im Dunkeln gelagert werden. Zur Unterscheidung zwischen vitalen und letalen Zellen wurde kurz vor der Messung Propidiumiodid (0,2 µg/ml) zu den Zellen gegeben.

5.5.2 Zytoplasmatische Immunfärbung

Bei der zytoplasmatischen Färbung wurden die Zellen vor der Zugabe der Antikörperlösung in 200 µl 0,25%-iger PFA-Lösung (in PBS) resuspendiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Zur Permeabilisierung der Zellmembran wurden die Antikörperlösungen mit 0,1% Saponin (in PBS) angesetzt.

5.5.3 FACS-Analyse

Die Messung wurde am FACSCalibur durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm CellQuest. Die Daten wurden als zweidimensionale „Punkt-Diagramme“ („dot-plots“) oder als eindimensionale Histogramme dargestellt und analysiert.

5.6 Gemischte Lymphozytenreaktion

Bei der allogenen gemischten Lymphozytenreaktion wurden CD4⁺ T-Zellen von einem Spender A mit PBMC von einem anderem Spender B im Verhältnis 1:1 in einer 24-Loch-Platte mit jeweils 5×10^5 CD4⁺ in IL-2-Medium für 6 Tage bei 37°C und 5% CO₂ stimuliert. Die T-Zellproliferation wurde durchflusszytometrisch über die Färbung mit CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester) bestimmt ^[33]. Zur Markierung der CD4⁺ T-Zellen wurden diese zuerst zweimal mit PBS gewaschen und 10×10^6 Zellen/ml mit einer 2 µM CFSE-PBS-Lösung für 4 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert und anschließend mit 30 ml PBS/10% FCS zum Abstoppen gewaschen. Zum Entfernen der restlichen Färbelösung wurde noch zweimal mit 20 ml IL-2-Medium gewaschen. Bei der Färbung gelangt membranpermeables CFDA-SE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) ins Zytoplasma der Zellen, wo es zur Abspaltung der Acetat-Gruppen durch intrazelluläre Esterasen kommt. Auf diesem Weg entsteht im Zytoplasma der Zellen das fluoreszierende nicht permeable CFSE, welches an intrazelluläre Moleküle bindet und somit über einen sehr langen Zeitraum im Zytoplasma nachweisbar ist ^[34]. Bei jeder Zellteilung wird der Farbstoff gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt und die daraus resultierende gleichmäßige Abnahme der Fluoreszenz und somit die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen ist mittels Durchflusszytometrie nachweisbar (siehe Abbildung 7). Die Messung der Vitalität der Zellen erfolgte über eine PI-Färbung.

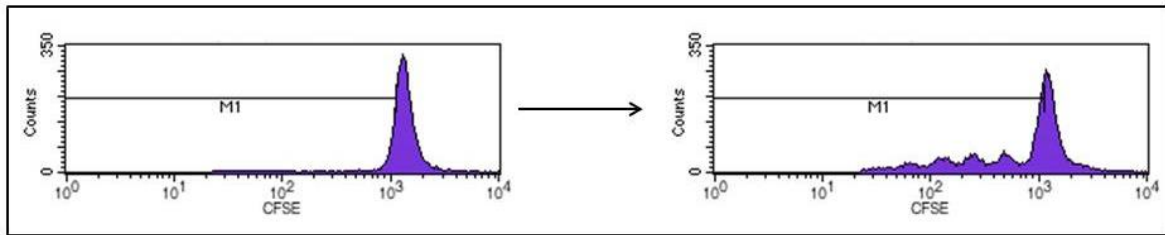


Abbildung 7: Beispiel für eine CFSE-Proliferationsanalyse. Die Messung der Proliferation von CD4⁺ T-Zellen erfolgt im Durchflusszytometer. Links: Im Histogramm sind alle gefärbten Zellen am Tag 1 nach der CFSE-Färbung angezeigt. Alle Zellen weisen direkt nach der Färbung die gleiche Fluoreszenzintensität auf. Rechts: Messung der Zellen nach 6 Tagen Inkubation. Es sind mehrere Populationen mit verschiedenen Fluoreszenzintensitäten sichtbar. Die Zellen im Markerbereich (M1) entsprechen den proliferierten Zellen. Counts auf der y-Achse: Anzahl der gemessenen Zellen; CFSE auf der x-Achse: CFSE-Fluoreszenzintensität (logarithmische Darstellung)

Nach 6 Tagen Inkubation erfolgte die Messung. Unstimulierte CD4⁺ T-Zellen wurden als Negativkontrolle und mit PHA-L (1 µg/ml am Tag des Versuchsansatzes) stimulierte Zellen als Positivkontrolle mitgeführt. Die inhibitorische Wirkung von UCMSC auf die Proliferation der T-Zellen wurde durch die Zugabe in verschiedenen Konzentrationen (1:5 bis 1:20, UCMSC:MLR) zu den MLR-Ansätzen nachgewiesen. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Excel Software (Microsoft Office).

5.7 Zytotoxizitätsanalyse

Zur Untersuchung der zytotoxischen Aktivität von CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL), im speziellen von der Subpopulation CD8⁺/CD28⁻ CTL, wurden diese mit mitotisch inaktivierten Endothelzellen für 7-Tage kokultiviert. Die mitotische Inaktivierung der Endothelzellen erfolgte für 24 Stunden mit Silibinin (5 mM), einem natürlich vorkommenden Flavonoid ^[35]. Dadurch verlieren die Zellen die Fähigkeit, sich weiter zu teilen. Es wurden sowohl Endothelzelllinien wie auch primäre Endothelzellen und endothelial differenzierte Zellen als Zielzellen für diesen Versuch eingesetzt. Die durchflusszytometrische Analyse des Zytotoxizitätstests erfolgte über die Membranfärbung der Zielzellen mit 3,3'-diocetadecyloxacarbocyanin Perchlorat (DIOC18₍₃₎; 30 µM) für 15 Minuten bei 37°C und 5% CO₂. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde ein drittes Mal mit IL-2-Medium gewaschen und anschließend die Effektorzellen mit den Zielzellen (1x10⁴ Zellen/100 µl) im Verhältnis von 20:1, 10:1 und 5:1 in einer 96-Loch-Platte in einem Gesamtvolumen von 200 µl IL-2-Medium zusammen pipettiert und für 4 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. In einer speziellen 96-Loch-Platte (*ultra-low attachment surface*) der Fa. Corning konnten die Zellen während der Inkubationszeit nicht adhären. Nach der Inkubation wurden die einzelnen Proben jeweils in ein FACS-Röhrchen überführt und zweimal mit PBS/10% FCS gewaschen. Das Zellpellet wurde mit 200 µl PBS/10% FCS resuspendiert. Die Messung der zytotoxischen Aktivität der CTL erfolgte über die Messung der Vitalität der Zielzellen durch

die Zugabe von Propidiumiodid (PI; 0,2 µg/ml). PI kann nur eine perforierte Zellmembran von nekrotischen bzw. spät-apoptotischen Zellen durchdringen.

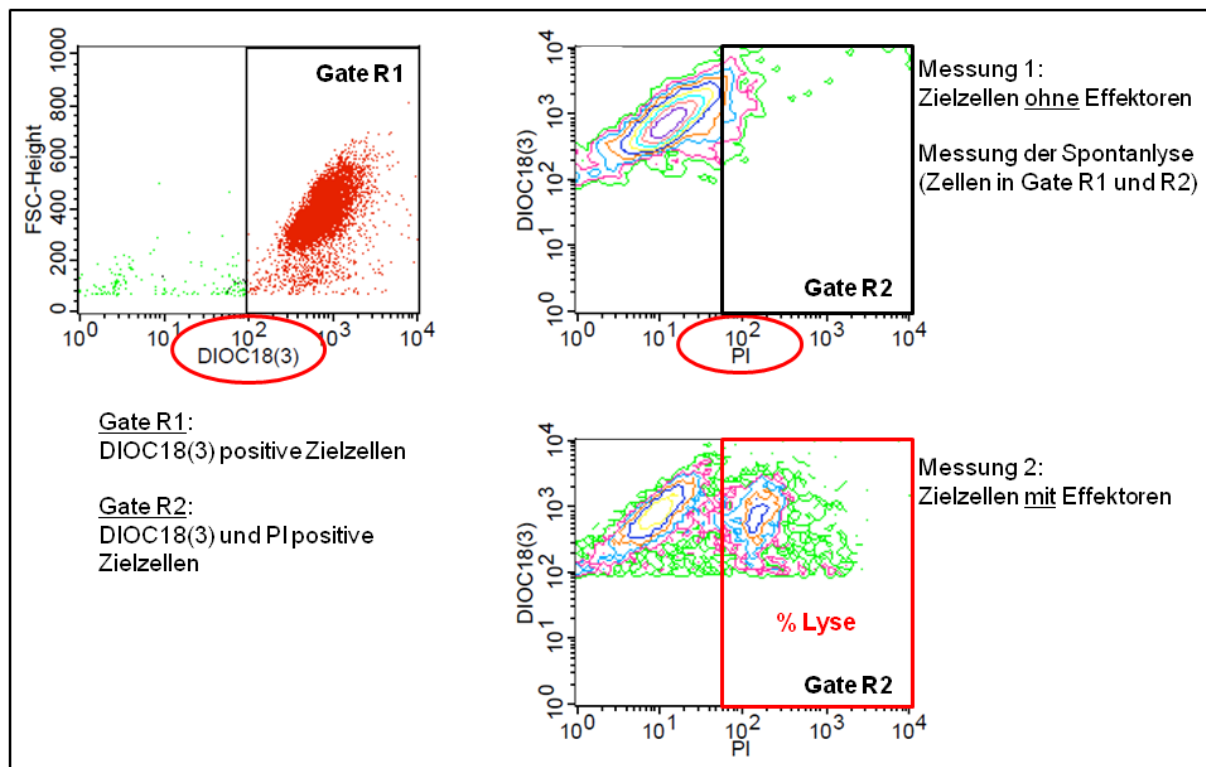


Abbildung 8: Messmaske des Zytotoxizitätstests im Durchflusszytometer. Die endothelialen Zielzellen wurden mit DIOC18₍₃₎ (Kanal: FL-1) gefärbt. Im Dotplot FSC/DIOC18₍₃₎ wurden die angefärbten Zellen bestimmt und mit einem Gate (R1) festgelegt. Im ContourPlot DIOC18₍₃₎/PI wurden alle Zellen aus R1 mittels PI (Kanal: FL-3) auf ihre Vitalität hin überprüft. Die spezifische Lyse der CTL ergab sich durch den Abzug der Spontanlyse von der gemessenen Lyse der Zielzellen.

Die spezifische lytische Aktivität der CTL ergab sich durch den Abzug der Spontanlyse der Zielzellen von der gemessenen Lyse der Zielzellen, welche mit den CTL koinkubiert waren. Die Spontanlyse ist die Lyse, die ohne die Koinkubation mit Effektoren bei den Zielzellen auftritt.

5.8 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Die Überstände von den durchgeführten Versuchen der allogenen gemischten Lymphozytenreaktionen wurden direkt nach der Entnahme bei -80°C gelagert. Die Expression von PGE₂ (Prostaglandin E₂) und dem Zytokin TGF-β (Transforming Growth Factor β) wurde mit speziellen Kits nach den Angaben des Herstellers über einen enzymgekoppelten Immunsorptionsassay in Duplikaten oder Triplikaten bestimmt. Allgemein wurden bei einem ELISA die Überstände auf einer Antikörper-beschichteten Platte in verschiedenen Verdünnungen inkubiert. Die Zytokine wurden spezifisch abgefangen und über einen zweiten Detektionsantikörper markiert. Durch Zugabe einer Substratlösung kam

es zu einem Farbumschlag. Nach dem Abstoppen der Reaktion wurde die Messung der Extinktion der einzelnen Proben mit einem Fotometer bei einer Wellenlänge von 405 bzw. 450 nm durchgeführt und die Zytokinkonzentration über eine Standardkurve bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Excel Software (Microsoft Office). Die statistische Signifikanz wurde mithilfe des t-Test ermittelt.

6 Ergebnisse

6.1 Isolierung und Charakterisierung von mesenchymalen Stammzellen aus dem Nabelschnurgewebe (UCMSC) unter verschiedenen Kulturbedingungen

Eine wesentliche Voraussetzung für den klinischen Einsatz von MSC ist, dass sich diese Zellen unter Bedingungen guter medizinischer Herstellungspraxis (GMP) in vitro kultivieren und expandieren lassen.

6.1.1 Isolierung von UCMSC

Die UCMSC wurden wie beschrieben (siehe Abschnitt 5.1.2) nach dem Protokoll von Seshareddy et al. ^[19] aus der Wharton'schen Sulze (WJC) und dem perivaskulären Bereich (PVSC) isoliert und zunächst in dem dort beschriebenen Medium (GM#1) kultiviert. Die Ausbeute an UCMSC war zum einem von der Nabelschnurlänge (15 – 50 cm) und zum anderen vom Zeitraum zwischen Geburt und Isolierung der Zellen abhängig.

Innerhalb eines Jahres wurden im Labor im Durchschnitt 98 Nabelschnurpräparationen sowohl für die Isolierung der Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) als auch für die Isolierung der MSC aus dem Nabelschnurgewebe durchgeführt. Die tatsächliche Ausbeute, d.h. die Anzahl der Präparationen, bei denen die isolierten UCMSC weiterpassagiert werden konnten, lag insgesamt bei 61,4%. Die Erfolgsquote lag in den ersten beiden Jahren im Durchschnitt bei 46,3%. Die Ausbeute konnte durch Optimierung der Zellkulturbedingungen (s.u.) in der folgenden Zeit auf über 90% gesteigert werden (siehe Tabelle 1).

Zur anwendungsorientierten Optimierung der Zellkulturbedingungen wurden UCMSC unter Bedingungen guter Herstellungspraxis (GMP) kultiviert. In den ersten beiden Jahren wurden die UCMSC zunächst sowohl im GM#1 als auch im Serumfreien Medium StemPro SFM[®] (SP) der Fa. Invitrogen getestet. Es war aber nicht möglich, die UCMSC in diesem Medium (SP) über einen längeren Zeitraum zu kultivieren und zu passagieren. Nur durch die Zugabe von 2% Humanserum (Pool-Humanserum; ZKT Tübingen) konnten die Zellen kultiviert und passagiert werden. Das Ziel war es, die UCMSC in komplett Serum- und Xeno-freiem (ohne tierische Komponenten) Medium klinisch nutzbar zu machen. Aus diesem Grund wechselte man im dritten Jahr zusätzlich zum GMP-konformen Medium MesenCult-XF[®] (MC) der Fa. Stemcell Technologies. Zur Bestimmung der optimalen Kulturbedingungen von UCMSC wurden sämtliche phänotypischen Kontrolluntersuchungen in den drei genannten Kulturmedien (GM#1, SP+2%HS und MC) durchgeführt.

Tabelle 1: UCMSC Präparationen. Innerhalb von 3 Jahren wurden in unserem Labor von insgesamt 294 Nabelschnüren UCMSC (WJC und PVSC) isoliert. Im Durchschnitt lag die Anzahl erfolgreicher Isolierungen insgesamt bei 61,4%. Im 3. Jahr verbesserte sich die Quote erfolgreicher Isolierungen auf über 90%.

UCMSC	WJC	PVSC
Anzahl an Präparationen (1.+2.+3. Jahr)	264 (85 + 85 + 94)	230 (62 + 82 + 86)
Anzahl an passagierbaren UCMSC (1.+2.+3. Jahr)	172 (36 + 47 + 89)	142 (19 + 44 + 79)
%-Anteil an passagierbaren UCMSC (1.+2.+3. Jahr)	64,1 (42,4 + 55,3 + 94,7)	58,7 (30,6 + 53,7 + 91,9)

6.1.2 Charakterisierung von UCMSC unter verschiedenen Kulturbedingungen

Morphologische Charakterisierung von UCMSC

Die verschiedenen Kultivierungsbedingungen von UCMSC hatten keinen Einfluss auf ihre spindelförmige, Fibroblasten-ähnlichen Morphologie (siehe Abbildung 9).

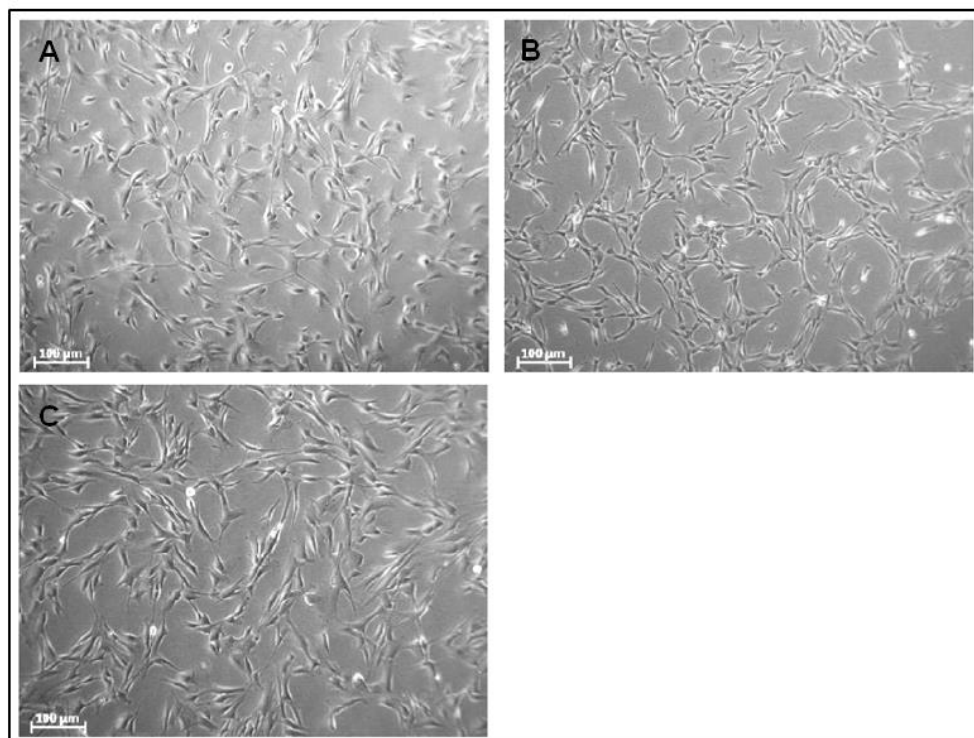


Abbildung 9: Charakteristische Fibroblasten-ähnliche Morphologie von mesenchymalen Stammzellen aus dem Nabelschnurgewebe (UCMSC). Aufnahmen im Phasenkontrast von Kulturen in Passage 3 . A: UCMSC im MC-Medium; B: UCMSC im SP+2%HS-Medium; C: UCMSC im GM#1-Medium; Maßstabskala: 100 µm

Phänotypische Charakterisierung von UCMSC

MSC lassen sich über eine Vielzahl an exprimierten und nicht-exprimierten Oberflächenmarkern klassifizieren [22]. In Anlehnung an Horwitz et al. [18] erfolgte die phänotypische Charakterisierung über die durchflusszytometrische Analyse von insgesamt 6 verschiedenen Markern. UCMSC wurden auf die Expression von CD73, CD90 und CD105 sowie durch die Abwesenheit hämatopoetischer Marker wie CD34 und CD45 sowie HLA-DR hin untersucht. Wie in Abbildung 10 zu sehen ist, lag die Expression der positiven Oberflächenmarker (CD73, CD90 und CD105) bei 100%, während CD34, CD45 und HLA-DR zu $\leq 2,7\%$ exprimiert waren.

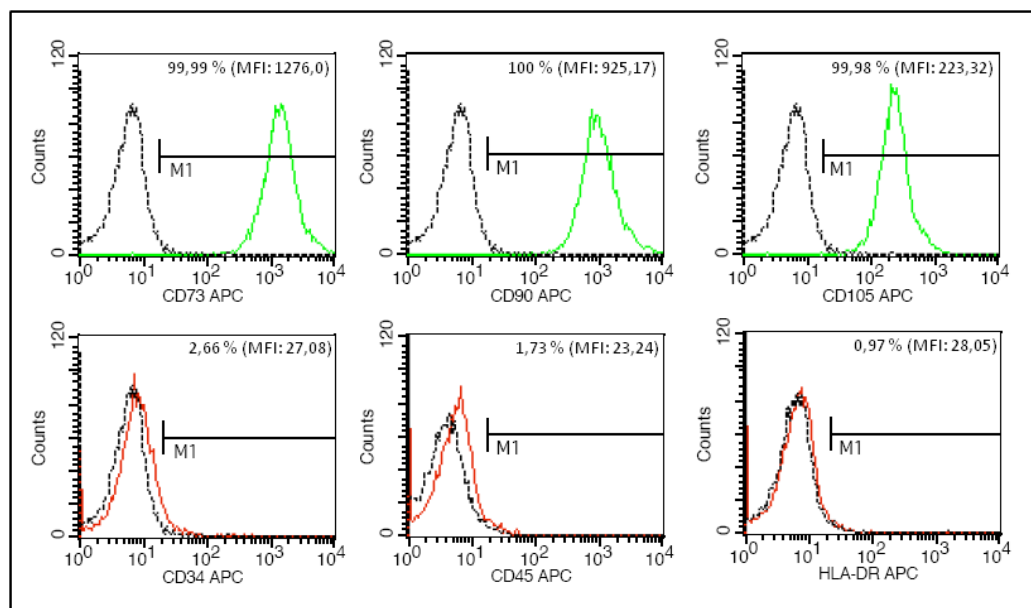


Abbildung 10: Durchflusszytometrische Analyse von UCMSC. Histogramme zeigen die MSC-spezifische Markerexpression (rote und grüne Linien) im Vergleich zum Isotyp (Negativkontrolle, schwarze gestrichelte Linie). Der Prozentsatz an positiven Zellen (Markerbereich M1) und die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI, *mean fluorescence intensity*) sind in der rechten oberen Ecke der Histogramme angegeben. APC: Allophycocyanin. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis einer GM#1 Zellkultur von insgesamt 152 durchgeführten Messungen.

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse von fünf unabhängig durchgeführten phänotypischen Messungen zusammengefasst. Es gab keinen grundlegenden Unterschied bei der Markerexpression zwischen den verschiedenen Kultivierungsbedingungen. Sowohl bei der Standardkultur mit FCS (GM#1) als auch bei der Kultur im GMP-Medium (MC) war die Expression positiver und negativer Antigene bei allen getesteten Zellen gleich. UCMSC exprimierten zu $>96\%$ die Marker CD73, CD90 und CD105. CD34, CD45 und HLA-DR

wurden zu <2% exprimiert. Nur anhand des MFI, die die Menge gebundener Antikörper als Parameter für die Menge an exprimierten Oberflächenantigenen widerspiegelt, konnte man einen Unterschied zwischen den verschiedenen Kulturbedingungen erkennen. Im MC-Medium kultivierte UCMSC exprimierten die zweifache Menge an CD73 (MFI: 1578 \pm 236) und CD90 (MFI: 2181 \pm 944), im Vergleich zu UCMSC in SP+2%HS (MFI: 737 \pm 144 bzw. MFI: 1111 \pm 292) bzw. in GM#1 Medium (MFI: 737 \pm 415 bzw. MFI: 1020 \pm 253). Es gab keine Auswirkungen auf die Expression der negativen Marker oder CD105 zwischen den einzelnen Kultivierungsbedingungen.

Tabelle 2: Auswertung durchflusszytometrischer Kontrollen von UCMSC. UCMSC wurden auf die Expression der Marker CD34, CD45, CD73, CD90, CD105 und HLA-DR untersucht. Die Markerexpression wurde zwischen den verschiedenen Kulturmedien GM#1, SP+2%HS und MC verglichen. Es sind jeweils die Mittelwerte positiver Zellen (%), die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) und die jeweilige Standardabweichung von 5 unabhängigen Experimenten angegeben.

Antigen	GM#1	SP+2%HS	MC
CD34	1,7 % (\pm1,5) MFI: 43 (\pm31)	1,0 % (\pm0,6) MFI: 25 (\pm10)	1,6 % (\pm1,0) MFI: 21 (\pm7)
CD45	0,3 % (\pm0,3) MFI: 60 (\pm24)	0,1 % (\pm0,1) MFI: 27 (\pm19)	0,2 % (\pm0,1) MFI: 21 (\pm8)
CD73	99,9 % (\pm0,1) MFI: 737 (\pm415)	100 % MFI: 737 (\pm144)	100 % MFI: 1578 (\pm236)
CD90	99,9 % (\pm0,1) MFI: 1020 (\pm253)	100 % MFI: 1111 (\pm292)	100 % MFI: 2181 (\pm944)
CD105	96,3 % (\pm4,8) MFI: 231 (\pm153)	100 % MFI: 244 (\pm60)	100 % MFI: 211 (\pm61)
HLA-DR	0,7 % (\pm0,4) MFI: 50 (\pm27)	0,3 % (\pm0,1) MFI: 29 (\pm23)	0,4 % (\pm0,3) MFI: 22 (\pm2)

Proliferationsanalyse von UCMSC

Neben der Morphologie und der Expression von MSC-Markern war auch der Vergleich der Zellausbeute in den verschiedenen Kulturmedien von großer Bedeutung. Um die Proliferationskapazität und die Vitalität von UCMSC bestimmen zu können, wurden UCMSC direkt nach der Isolierung in den verschiedenen Zellkulturmedien GM#1, SP+2%HS und MC unter den exakt gleichen Bedingungen für insgesamt fünf Passagen kultiviert. In jeder Passage wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen in einer 25 cm² Zellkulturflasche ausgesät und Zellzahl und

Vitalität in jeder Passage mit einer Trypanblau-Färbung (siehe Abschnitt 5.2.2) bestimmt. Sowohl die Proliferationskapazität (>5-fache Proliferation der Ausgangszellzahl in jeder Passage) als auch die Vitalität (>90%) der UCMSC war über alle Passagen im komplett Serum- und Xeno-freiem MC Medium am besten (siehe Abbildung 11). Im Vergleich dazu zeigten UCMSC im FCS-haltigen GM#1 Medium eine deutlich eingeschränkte Proliferation (<5-fach) und auch eine deutlich verringerte Vitalität (75-88%).

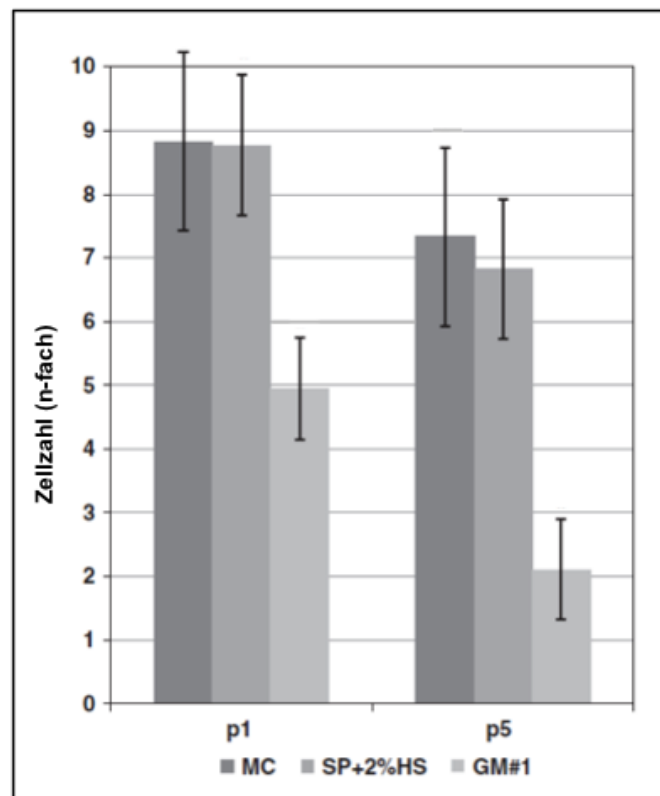


Abbildung 11: Proliferation von UCMSC in Passage 1 (p1) und in Passage 5 (p5). Die Proliferation wurde zwischen den verschiedenen Kulturmedien GM#1-Medium, SP+2%HS-Medium und MC-Medium verglichen. Die Zunahme ist in n-facher Menge der ausgesäten Zellzahl ($2,5 \times 10^5$) mit der Standardabweichung als Mittelwerte von fünf Zählungen angegeben. UCMSC, die im MC- bzw. SP+2%HS-Medium kultiviert wurden, zeigten eine signifikant höhere Proliferationskapazität gegenüber UCMSC im GM#1 ($p < 0,05$).

6.1.3 Funktionelle Charakterisierung von UCMSC

Adipogene und Osteogene Differenzierung von UCMSC unter verschiedenen Kulturbedingungen

Um zu zeigen, dass das Serum- und Xeno-freie Medium keine Auswirkungen auf die adipogene und osteogene Differenzierung von UCMSC hat, wurden die entsprechenden Differenzierungsansätze in den drei verschiedenen Medien angesetzt und nach 19 Tagen Inkubation entsprechende Nachweissfärbungen (OilredO und Alizarinrot) durchgeführt (siehe Abbildung 12). UCMSC konnten unter allen getesteten Kulturbedingungen sowohl adipogen

als auch osteogen differenziert werden. Somit konnte auch auf funktioneller Ebene nachgewiesen werden, dass das GMP-konforme Medium MC sich für die Zellkultur von UCMSC eignet.

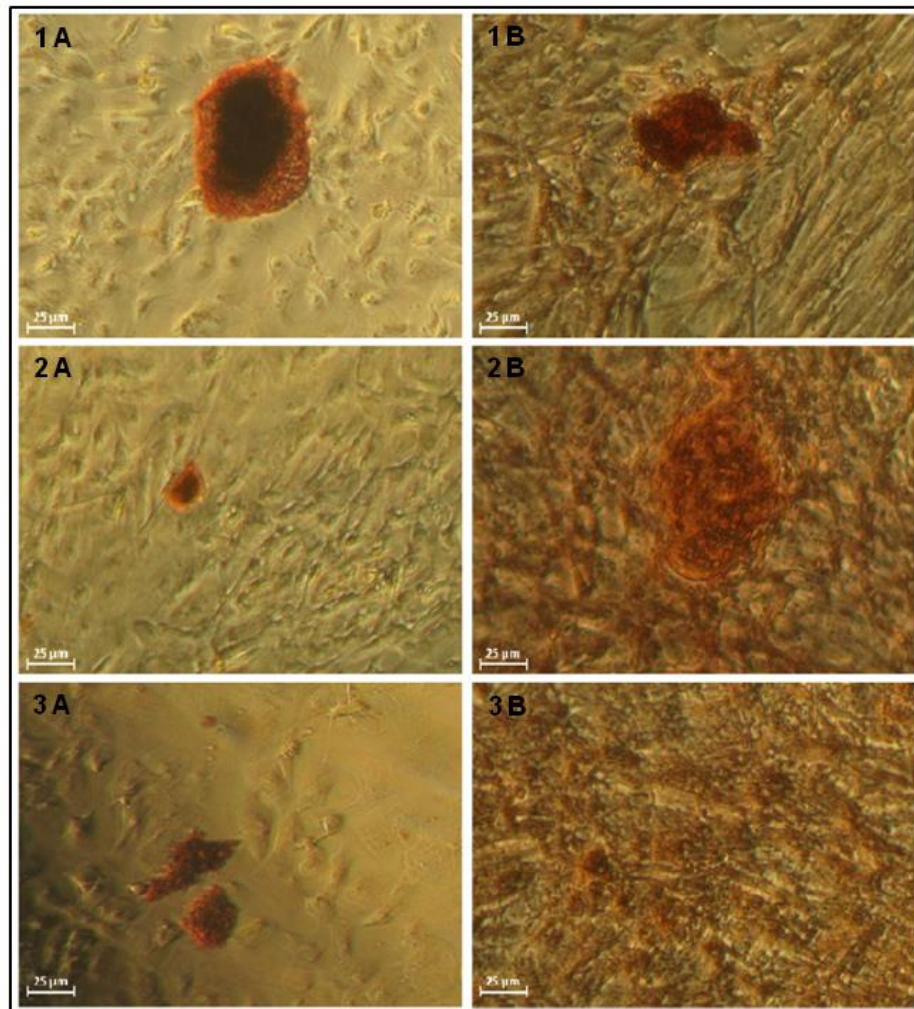


Abbildung 12: Adipogene und osteogene Differenzierungsfähigkeit von UCMSC unter verschiedenen Kulturbedingungen. Die Adipozyten-Differenzierung (A) wurde mit einer OilredO-Färbung (rote Lipidtröpfchen) und die Osteozyten-Differenzierung (B) wurde mit einer Alizarinrot-Färbung (Kalzifikation, rot) nach 19 Tagen in Kultur mit dem Differenzierungsmedium nachgewiesen. 1: MC-Kultur; 2: SP+2%HS-Kultur; 3: GM#1-Kultur; Maßstabskala: 25 µm

Endotheliale Differenzierung von UCMSC

UCMSC wurden wie beschrieben (siehe Abschnitt 5.3) endothelial differenziert und mit einem Antikörper gegen den von Willebrand Faktor gefärbt sowie im Matrigel™ auf Tubenbildung untersucht. Als endotheliale Positivkontrolle wurden HUVEC (Endothelzellen aus der Nabelschnurvene) verwendet. Es konnte bei beiden Nachweismethoden ein klarer Unterschied zu den undifferenzierten UCMSC festgestellt werden, welche weder eine spezifische vWF Färbung (siehe Abbildung 13) aufwiesen noch die Fähigkeit zur Ausbildung eines kapillaren Netzwerksystems (siehe Abbildung 15) im Angiogenese-Test zeigten. Die

unterschiedlichen Kulturbedingungen hatten wiederum keinen Einfluss auf die endotheliale Differenzierung.

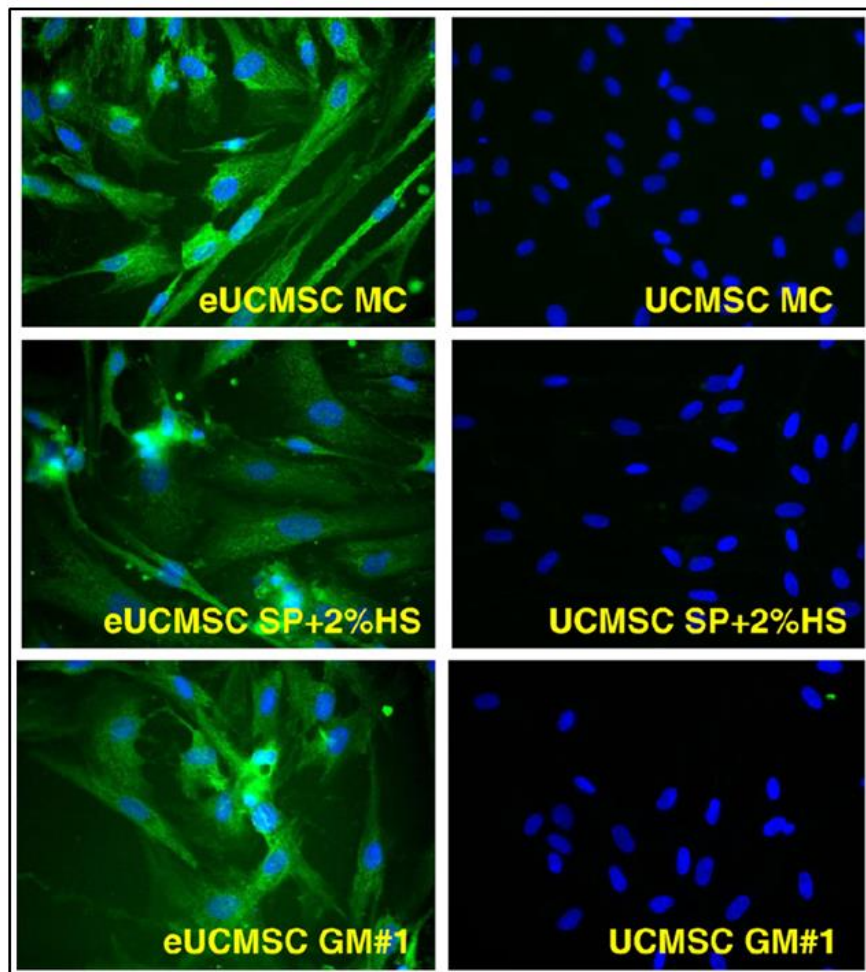


Abbildung 13: Endotheliale Differenzierung von UCMSC unter verschiedenen Kulturbedingungen. Nachweis der Differenzierung über Nachweis einer vWF-Färbung (grün). eUCMSC: endothelial differenzierte MSC; UCMSC: undifferenzierte MSC; blau: nukleäre Gegenfärbung mit DAPI; Aufnahme: 400x Vergrößerung

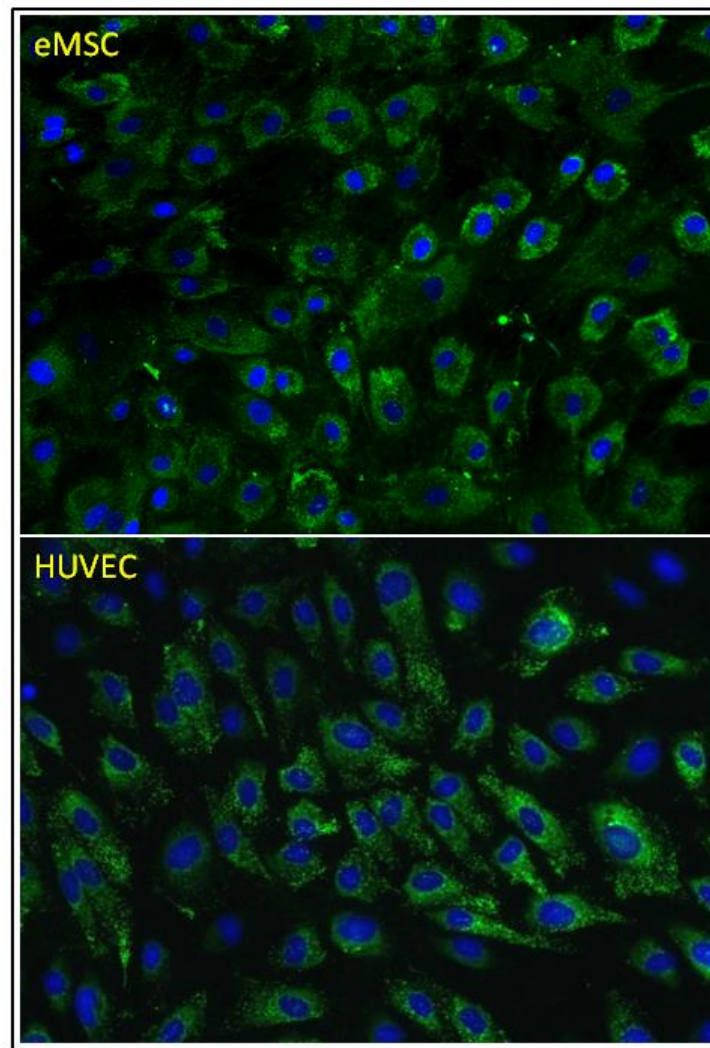


Abbildung 14: Nachweis der endothelialen Differenzierung über eine vWF-Färbung (grün). Vergleich zwischen endothelial differenzierten MSC (eMSC in MC-Kultur) und HUVEC (Endothelzellen aus der Nabelschnurvene) als Positivkontrolle; blau: nukleäre Gegenfärbung mit DAPI; Aufnahme: 400x Vergrößerung

Für einen möglichen klinischen Einsatz endothelial differenzierter UCMSC zur Behandlung transplantationsassoziierter Komplikationen wurde diese Form der Differenzierung ebenfalls unter GMP-konformen Kulturbedingungen getestet (siehe Abbildung 14). Aus diesem Grund wurden zur Differenzierung der UCMSC die entsprechenden Medienzusätze direkt zum MC Medium gegeben und nicht wie zuvor das komplette Medium gewechselt.

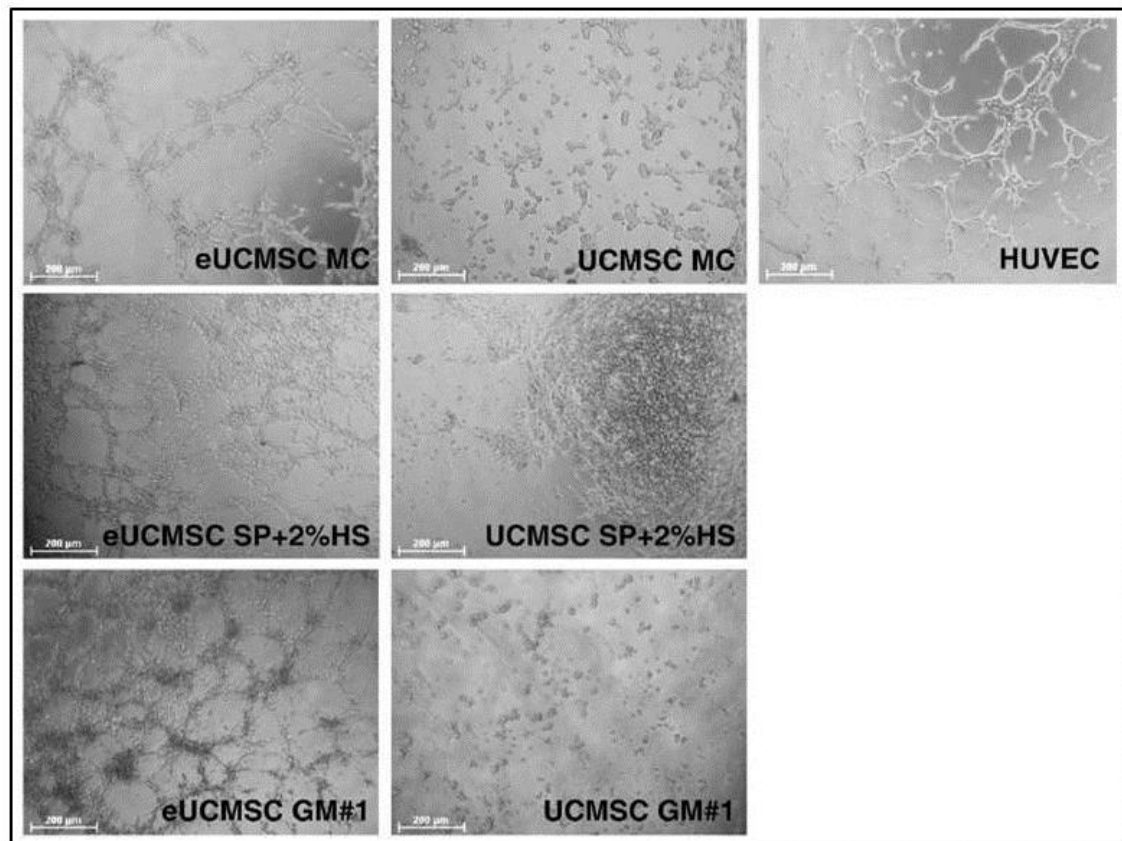


Abbildung 15: Matrigel™ Angiogenese-Test. Nachweis der endothelialen Differenzierung von UCMSC über die Fähigkeit zur Tubenbildung in einer extrazellulär-ähnlichen Matrix nach vier Stunden Inkubation. eUCMSC: endothelial differenzierte MSC; UCMSC: undifferenzierte MSC; HUVEC: Endothelzellen aus der Nabelschnurvene als Positivkontrolle; Maßstabskala: 200 µM

6.1.4 UCMSC besitzen immunsuppressive Eigenschaften

Es ist bekannt, dass MSC immunsuppressive Eigenschaften besitzen ^[24,25]. Neben der Differenzierungskapazität wurden auch die immunsuppressiven Eigenschaften von UCMSC unter den verschiedenen Kulturbedingungen untersucht.

UCMSC zeigten in CFSE-Proliferationsanalysen (siehe Abschnitt 5.6) eine inhibitorische Wirkung auf die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen in einer allogenen gemischten Lymphozytenreaktion (MLR). Wie in Abbildung 16 zu sehen ist, lag die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen ohne Stimulus bei durchschnittlich 34%. Im Vergleich zur MLR (100%), konnte durch die Zugabe von UCMSC die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen auf das Niveau (30-47%) der einzig durch IL-2 stimulierten CD4⁺ T-Zellen herunterreguliert werden. Die suppressive Wirkung von UCMSC war in allen Fällen signifikant. Die durchschnittliche Proliferation von CD4⁺ T-Zellen innerhalb einer MLR wurde durch die Zugabe von UCMSC, kultiviert in MC-Medium, komplett inhibiert. Ein ähnlicher Effekt wurde bei den mit FCS kultivierten UCMSC (GM#1) erzielt. Es konnte keine 100%-ige Suppression durch UCMSC nachgewiesen werden, welche zunächst im Medium mit humanen Serum (SP+2%HS) expandiert wurden.

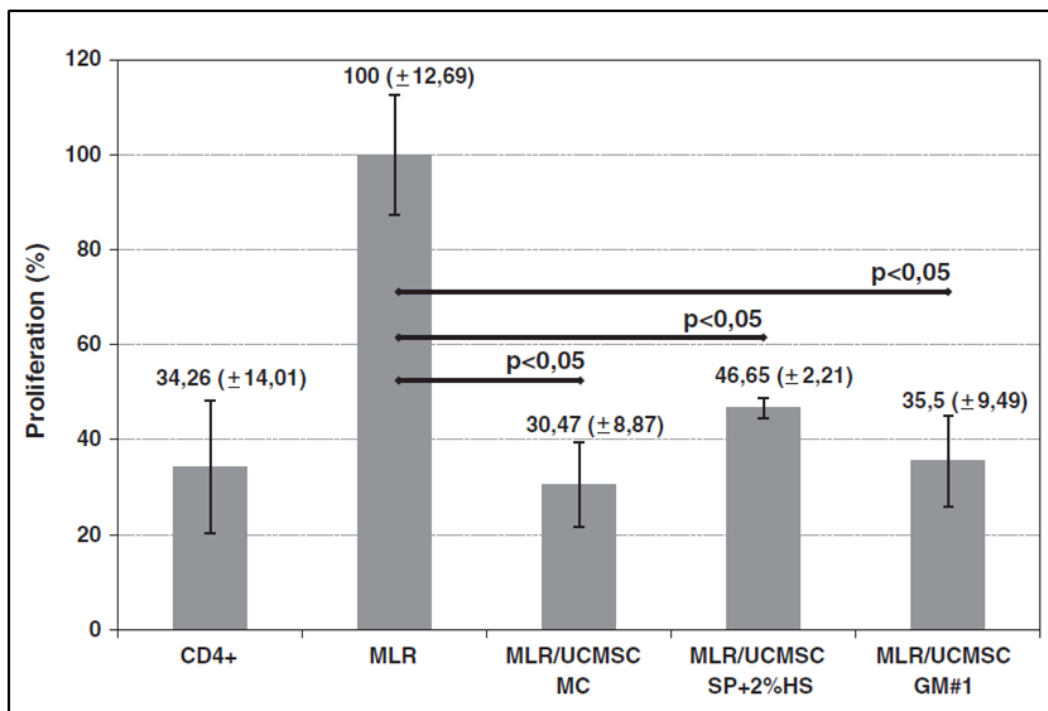


Abbildung 16: Inhibition der Proliferation von CD4+ T-Zellen durch UCMSC im Verhältnis 5:1. CFSE-Proliferationsanalyse einer allogenen MLR nach 6 Tagen Inkubation. Der Proliferation des MLR-Ansatzes ohne UCMSC wurde auf 100 % gesetzt. Die Proliferation der CD4+ T-Zellen ohne APC ist links aufgeführt. Die immunsuppressive Aktivität der UCMSC ist bei den verschiedenen Kulturbedingungen signifikant. Prozentuale Angabe der Proliferation der CD4+ T-Zellen und der Standardabweichung über den einzelnen Balken. GM#1: Growth Medium #1, Seshareddy et al.^[19]; SP+2%HS: StemPro SFM®; MC: MesenCult-XF®; p<0,05: signifikant; durchschnittliches Ergebnis von jeweils 3 unabhängigen Versuchen.

6.1.5 Die immunsuppressive Wirkung von UCMSC basiert nicht auf direktem Zell-Zell-Kontakt

Die inhibitorische Wirkung von UCMSC auf die T-Zellproliferation war nicht von direkten Zell-Zell-Kontakten abhängig, da die Stammzellen auch in einem Transwell-System das Wachstum der immunologischen Effektorzellen blockieren konnten (siehe Abbildung 17). Die UCMSC waren in einer separaten Kammer durch eine Polycarbonat-Membran (Porengröße 0,4 µm) von der MLR getrennt. Nur lösliche Faktoren konnten somit über die Membran ausgetauscht werden.

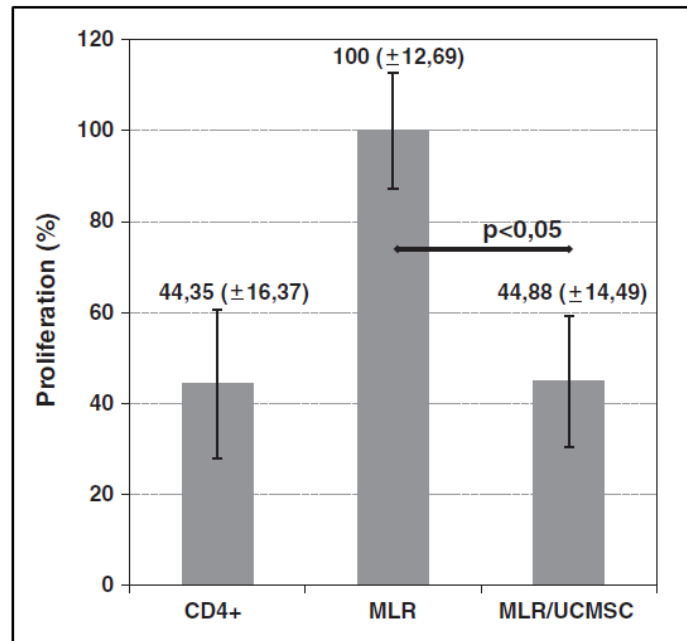


Abbildung 17: Kontaktunabhängige Inhibition der allogenen MLR durch UCMSC im Verhältnis 5:1. Die inhibitorische Wirkung von UCMSC (MC-Kultur) wurde im Transwell-System überprüft. Prozentuale Angabe der Proliferation der CD4⁺ T-Zellen bezogen auf den Wert des MLR-Ansatzes ohne Zugabe von UCMSC nach 6 Tagen und der Standardabweichung über den einzelnen Balken. $p < 0,05$: signifikant; durchschnittliches Ergebnis von 3 unabhängigen Versuchen.

Die räumliche Trennung der UCMSC (MC) zur MLR hat keine Auswirkung auf die inhibitorische Wirkung von UCMSCs. Es zeigt sich ebenfalls, wie bei direktem räumlichen Kontakt, eine 100%-ige Hemmung der Proliferation von CD4⁺ T-Zellen auf das Grundniveau.

6.1.6 Die inhibitorische Wirkung von UCMSC ist Prostaglandin-abhängig

Der Wirkmechanismus der MLR-Inhibition war in erster Linie auf die Freisetzung von Prostaglandin E₂ (PGE₂) zurückzuführen. Die Zellkulturüberstände der allogenen MLR wurden mittels ELISA auf verschiedene Zytokine (IL-6, TGF- β , IFN- γ und PGE₂) hin untersucht. UCMSC in einer MLR-Kultur exprimierten große Mengen an PGE₂ (siehe Abbildung 18), UCMSC ohne eine MLR in Kultur exprimierten nur äußerst geringe Mengen an PGE₂ (Daten nicht gezeigt). Dass der Wirkmechanismus von PGE₂ abhängig war, wurde durch die Synthesehemmung von PGE₂ überprüft. Durch die Zugabe von Indomethacin (PGE₂-Syntheseinhibitor; 25 μ M) konnte kein PGE₂ im Überstand mittels ELISA mehr nachgewiesen werden und auch keine inhibitorische Wirkung bei der CFSE-Analyse (siehe Abbildung 19).

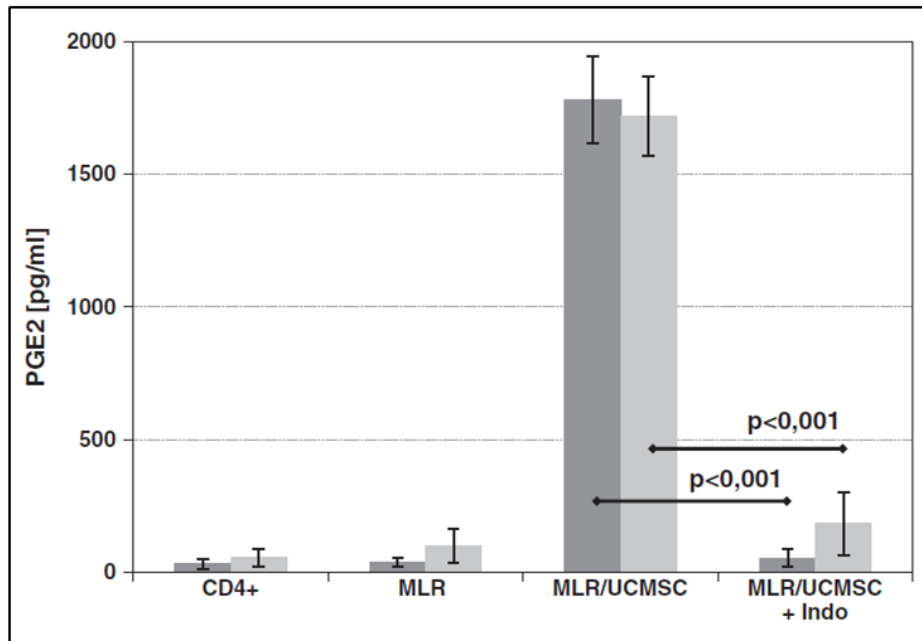


Abbildung 18: Bestimmung der PGE₂-Konzentration in den Zellkulturüberständen einer allogenen MLR, in denen die UCMSC (im MLR:UCMSC-Verhältnis 5:1) sowohl direkt zu der MLR gegeben wurden (dunkelgraue Balken), bzw. indirekt in einem Transwell, so dass kein Zell-Zell-Kontakt möglich war (hellgraue Balken). Gezeigt sind pg/ml PGE₂ ± Standardabweichung eingezeichnet; p<0,001: hoch signifikanter Unterschied zwischen der MLR in Gegenwart der UCMSC vs. der PGE₂-Synthese-Inhibition mit Indomethacin (Indo; 25 µM); Ergebnis von 3 unabhängigen Versuchen.

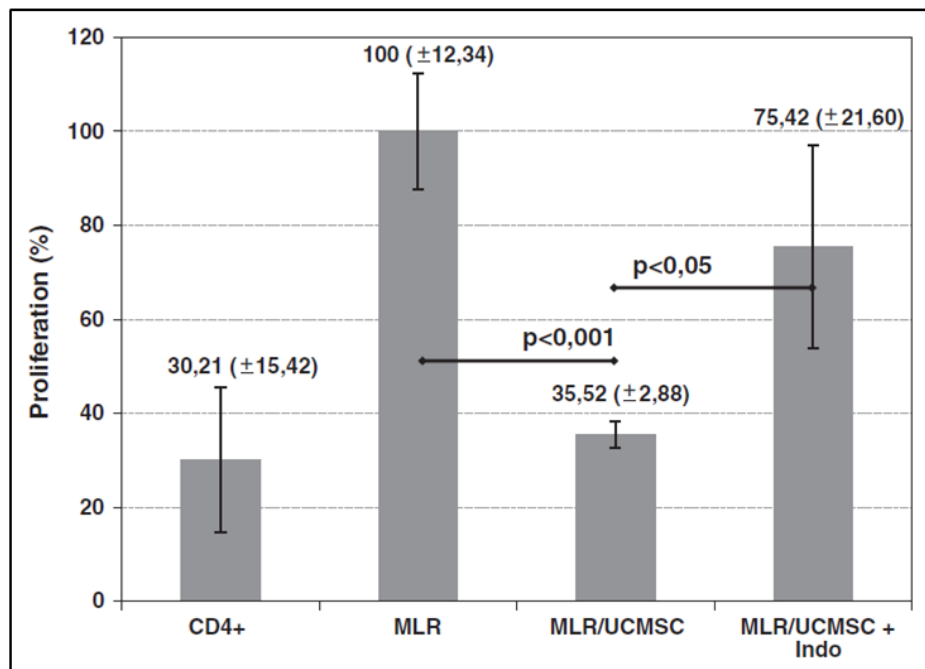


Abbildung 19: Inhibition einer MLR durch Zugabe von UCMSC bei einem Verhältnis 5:1 im Vergleich zur CD4+ T-Zell Kontrolle. Durch Zugabe von Indomethacin (Indo; 25 µM) ist diese Wirkung reversibel. Prozentuale Angabe der Proliferation der CD4+ T-Zellen und der Standardabweichung über den einzelnen Balken. p<0,05: signifikant; p<0,001: hoch signifikant; Ergebnis von 3 unabhängigen Versuchen

PGE₂ ist der Hauptfaktor bei der UCMSC bedingten Inhibition einer allogenen MLR. Die Synthesehemmung variierte Spender-abhängig, war aber niemals vollständig, was darauf schließen ließ, dass PGE₂ nicht der einzige Faktor sein konnte, der die MLR blockierte. Auch Indolamine-2,3-Dioxygenase (IDO) könnte eine Rolle spielen ^[36]. Daher wurde in einem präliminären Versuch der IDO-spezifische Inhibitor 1-L-Methyltryptophan (1-MT; 1,5 mM) in einer allogenen gemischten Lymphozytenreaktion eingesetzt (siehe Abbildung 20).

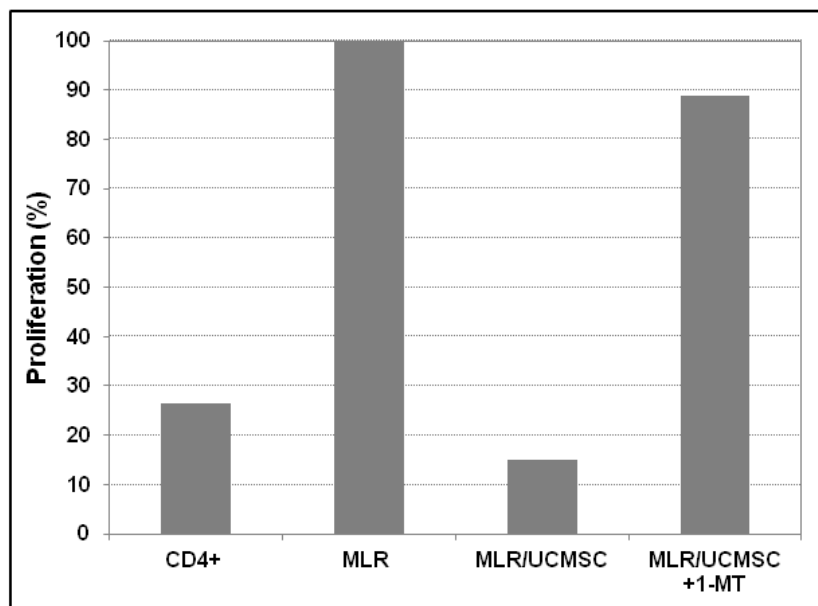


Abbildung 20: Inhibition einer MLR durch Zugabe von UCMSC bei einem Verhältnis 5:1 im Vergleich zur CD4+ T-Zell Kontrolle. Durch Zugabe von 1-Methyltryptophan (1-MT; 1,5 mM) ist diese Wirkung reversibel. Gezeigt ist ein einmaliger Versuch.

1-MT ist ein IDO-spezifischer Enzym-Inhibitor. Wie in Abbildung 20 zu sehen ist, war die Inhibierung der allogenen MLR (100%) durch UCMSC reversibel, die Proliferation der CD4+ T-Zellen stieg von 15% auf 88%. Wie bei PGE₂ war dieser Effekt nicht von der Ko-Kultur der MSC mit der MLR abhängig, auch im Transwell-System ergab sich dasselbe Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Ähnlich den Ergebnissen zu PGE₂ und dem Syntheseinhibitor Indomethacin, ergab sich keine vollständige Reversibilität durch die alleinige Zugabe von 1-MT. Somit spielen sowohl PGE₂, als auch IDO eine entscheidende Rolle bei der immunsupprimierenden Wirkung von UCMSC. Da aber in keinem der Experimente eine 100%-ige Reversibilität erreicht wurde, bleiben weitere Faktoren bzw. sollte eine Kombination mit PGE₂ und IDO untersucht werden, um somit den kompletten Wirkmechanismus aufschlüsseln zu können.

6.2 Regulatorische T-Zellen

Neben UCMSC besitzen auch regulatorische T-Zellen (Treg-Zellen) inhibitorische Eigenschaften auf zelluläre Alloreaktionen. Studien haben gezeigt, dass Treg-Zellen vielversprechend in der adjuvanten Immuntherapie zur Toleranzinduktion sind, z.B. zur Behandlung der akuten „*graft-versus-host disease*“ (GVHD) nach allogener Stammzelltransplantation ^[9,10,11]. Um den Einfluss von Treg-Zellen auf die Wirkung von zytotoxischen CD8+ T-Lymphozyten gegenüber vaskulären Endothelzellen zu untersuchen, wurden diese zunächst phänotypisch und funktionell charakterisiert.

6.2.1 Isolierung von CD4+/CD25+/FoxP3+ Treg-Zellen

Die CD4+/CD25+/FoxP3+ Treg-Zellen wurden mittels eines Isolierungskits nach Herstellerangaben (siehe Abschnitt 5.1.4) separiert. Durchschnittlich wurden bei einem Einsatz von ca. 1×10^9 naiven PBMC im ersten Schritt der Negativselektion etwa $1,5\text{--}2 \times 10^8$ CD4+ T-Zellen gewonnen, entsprechend einer Ausbeute von 15-20%. Im zweiten Schritt konnten durchschnittlich 5×10^6 CD25+ T-Zellen positiv selektioniert und auf Treg-Zellmarker getestet werden. Die Ausbeute der Isolierung von Treg-Zellen war Spender-abhängig und lag im Durchschnitt bei 0,5% der ursprünglich eingesetzten Zellmenge. Die Expansion der Treg-Zellen erfolgte durch die Ko-Kultur mit CD3/CD28 Dynabeads® der Fa. Invitrogen im Verhältnis 3:1 (Beads : Treg-Zellen).

6.2.2 Phänotypische Charakterisierung von Treg-Zellen

Die Treg-Zellen wurden direkt nach Isolierung und *ex vivo* Expansion, vor dem Einsatz in den funktionellen Tests auf eine bestimmte Markerkombination (siehe Abbildungen 21,22) hin untersucht. Wie in der Literatur beschrieben, definieren sich Treg-Zellen über die positive Oberflächenexpression von CD4, CD25, CD45RA, CCR-7, CTLA-4 und GITR ^[37]. Treg-Zellen sind für CD127 negativ bzw. sehr schwach positiv (CD127^{dim/-}). Im Gegensatz zu konventionellen T-Zellen exprimieren Treg-Zellen intrazellulär den Transkriptionsfaktor FoxP3. Wie in Abbildung 21 und 22 zu sehen ist, erfüllten unsere Treg-Zellen diese Kriterien.

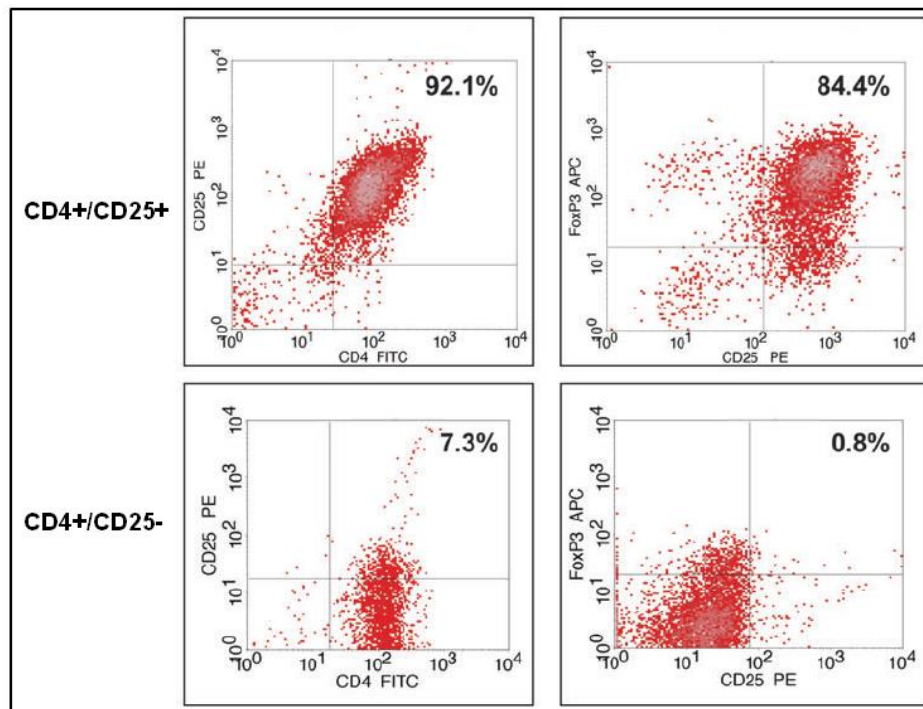


Abbildung 21: Durchflusszytometrische Analyse von CD4+/CD25+/FoxP3+ Treg-Zellen und CD4+/CD25-/FoxP3- konventionellen T-Zellen. Treg-Zellen und konventionelle T-Zellen wurden mit Phycoerythin bzw. Fluorescein Isothiocyanate (FITC) markierten Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD4 und CD25, sowie intrazellulär gegen FoxP3 gefärbt. ^[38] Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch von vier unabhängigen Versuchen.

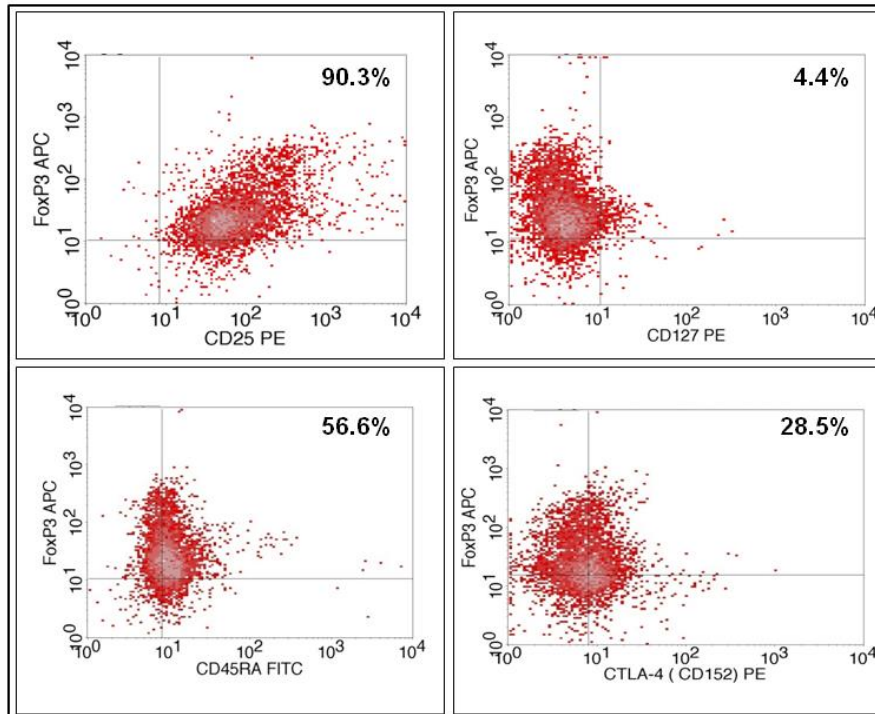


Abbildung 22: Durchflusszytometrische Analyse von CD4+/CD25+/FoxP3+ Treg-Zellen. Treg-Zellen exprimieren neben den Marker CD25 und FoxP3 auch in geringerem Maße die Marker CD45RA und CTLA-4 (CD152). Treg-Zellen exprimieren kein CD127. Allophycocyanin (APC), Phycoerythin (PE), Fluorescein Isothiocyanate (FITC). ^[38] Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch von vier unabhängigen Versuchen.

6.2.3 Funktionelle Charakterisierung von Treg-Zellen

Um die Funktionalität der Treg-Zellen nachzuweisen, wurde ihre inhibitorische Wirkung auf eine allogene MLR mittels eines CFSE-Proliferationsassay (siehe Abbildung 23) überprüft. Treg-Zellen wurden wie in Methodenteil beschrieben (siehe Abschnitt 5.6) zu einer MLR gegeben und die Auswirkungen auf die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen im Durchflusszytometer gemessen. CD4⁺ T-Zellen zeigten ohne Stimulation nur eine geringe Proliferation, in Kokultur mit allogeenen PBMC proliferierten sie hingegen stark, was erwartungsgemäß von den Treg-Zellen inhibiert wurde.

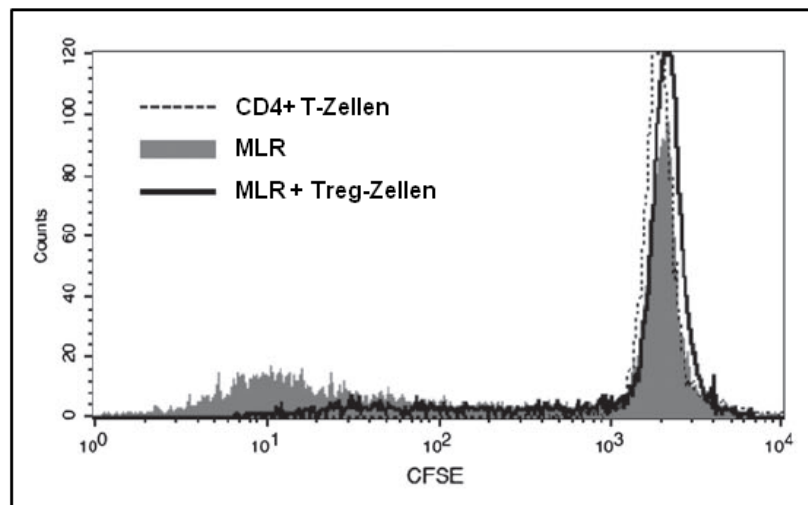


Abbildung 23: Funktionelle Charakterisierung der Treg-Zellen in der MLR. CD4⁺ T-Zellen wurden mit CFSE gefärbt und 6 Tage in einer MLR mit und ohne Treg-Zellen im Verhältnis 5:1 inkubiert. Der Nachweis der Proliferation erfolgte durch Messung der CFSE-Fluoreszenz von vitalen CD4⁺ T-Zellen. Durch die Zugabe der Treg-Zellen zu einer allogeenen MLR (schwarze Linie) wird die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen (gestrichelte Linie) gegen allogeene PBMC (MLR) (grau unterlegt) inhibiert. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch von drei unabhängigen Versuchen.

6.3 Charakterisierung Endothel-spezifischer Alloreaktionen

In der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Eißner wurden in Vorarbeiten (Zytotoxizitätstests) Endothel-spezifische zytotoxische CD8⁺ T-Lymphozyten (CTL) identifiziert. Die Endothelspezifität wurde durch den Einsatz HLA-identer Epstein-Barr-Virus-transformierter lymphoblastoider B-Zellen (BLCL) nachgewiesen. In diesem Fall kam es in Zytotoxizitätstests zu keiner Lyse der BLCL durch die zuvor Endothel-stimulierten CTL (Daten nicht gezeigt). Desweiteren wurde festgestellt, dass durch die Zugabe von Treg-Zellen zu einer Ko-Kultur von CTL und Mitose-inaktivierten Endothelzellen (HMEC; Humane mikrovaskuläre Endothelzelllinie ^[32]) diese deutlich in ihrer lytischen Aktivität verstärkt wurden. Eine direkte Wirkung der Treg-Zellen auf die HMEC konnte weitestgehend ausgeschlossen werden, da die Treg-Zellen in Abwesenheit der zytotoxischen Effektoren selbst keine Aktivität gegen die HMEC zeigten. Darüber hinaus brachte auch die

Präinkubation von HMEC mit Treg-Zellen in anschließenden Zytotoxizitätstests kein Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Daraus ergaben sich zwei mögliche Hypothesen zur Erklärung der erhöhten lytischen Aktivität von Endothel-spezifischen CTL durch Treg-Zellen. Die erste Hypothese umfasste die direkte verstärkende Auswirkung von Treg-Zellen auf die CTL. Die zweite Hypothese ging von dem Vorkommen CD8+ Suppressor-T-Zellen im CD8+ T-Zell-Gemisch aus, welche in ihrer inhibitorischen Aktivität durch die Treg-Zellen blockiert wurden.

6.3.1 Treg-Zellen verstärken die lytische Aktivität von CD8+/CD28- CTL

Die zweite Hypothese war zunächst zu favorisieren, da CD8+ Suppressorzellen in einer CD8+ T-Zell-Kultur nicht auszuschließen waren und für Treg-Zellen bislang noch keine verstärkende Wirkung auf T-Zell-Reaktionen beschrieben worden war. In der Literatur wurden CD8+ Suppressorzellen beschrieben, die für den Korezeptor CD28 negativ sind ^[39]. In der Annahme, dass die Isolierung von CD8+/CD28+ CTL zum Verlust der Suppressorzellen führte, wurden die Subpopulationen CD8+/CD28+ und CD8+/CD28- separiert, mit HMEC stimuliert und die CD8+ CTL funktionell in Zytotoxizitätstest eingesetzt. Entgegengesetzt zum erwarteten Ergebnis konnte eindeutig gezeigt werden, dass die CD8+/CD28- T-Zellen gegenüber dem Endothel eine deutlich stärkere lytische Aktivität aufwiesen als CD8+ bzw. CD8+/CD28+ CTL (siehe Abbildung 24).

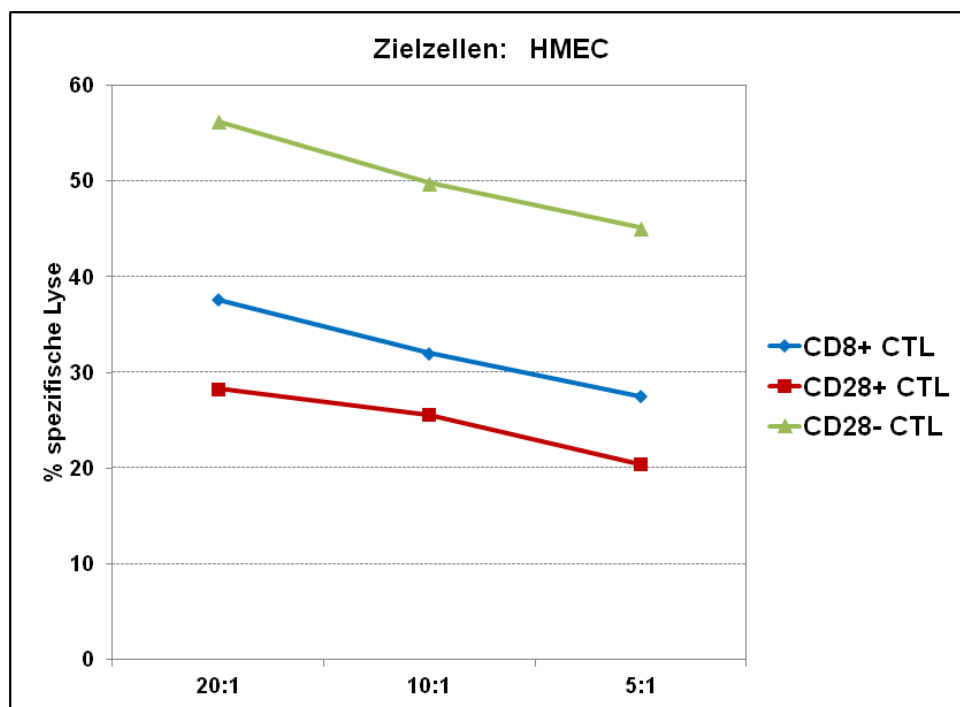


Abbildung 24: Lyse von HMEC durch Endothel-spezifische CD8+ CTL (blaue Linie) wird durch die vorherige Aufreinigung CD8+/CD28- CTL (grüne Linie) deutlich gesteigert. CD8+/CD28+ CTL (rote Linie) zeigen keine Verstärkung der Lyse, welche im Bereich von CD8+ CTL liegt. Die spezifische Lyse wird prozentual angezeigt. Das Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen war 20:1, 10:1 und 5:1; Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch von fünf unabhängigen Experimenten.

Durch die Koinkubation von Treg-Zellen mit CD8+/CD28- CTL wurden diese deutlich in ihrer lytischen Aktivität verstärkt. Im Gegensatz dazu wurden CD8+/CD28+ T-Zellen von Treg-Zellen nicht beeinflusst (siehe Abbildung 25).

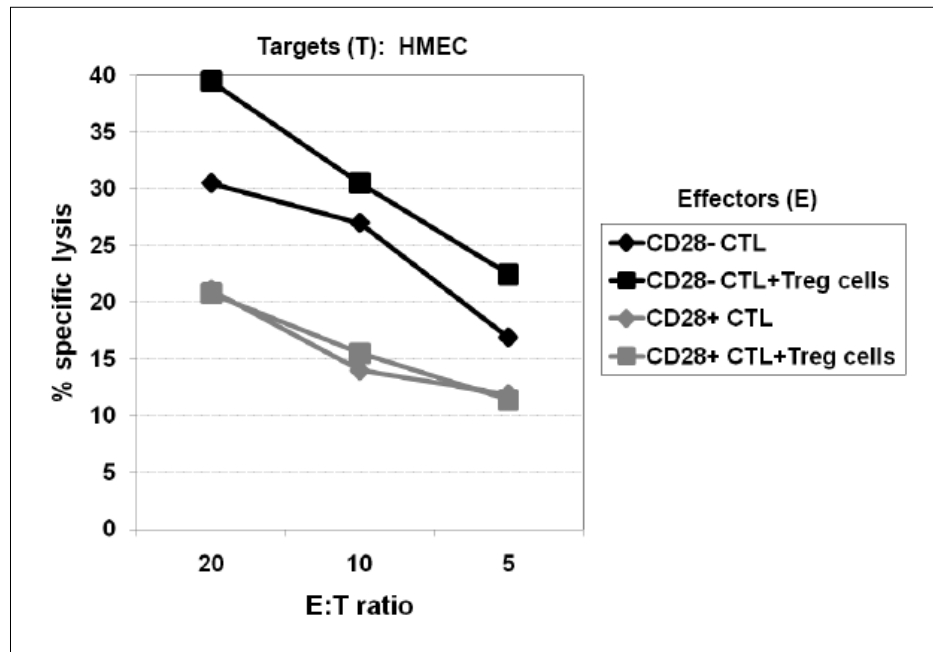


Abbildung 25: Durch die Zugabe von Treg-Zellen (schwarze Linie, Quadrat) zu den CD8+/CD28- Effektor-CTL (schwarze Linie, Raute) wird die lytische Aktivität verstärkt. Die Zugabe zu den CD8+/CD28+ T-Zellen (graue Linien) führt zu keiner Erhöhung der zytotoxischen Aktivität. Die spezifische Lyse wird prozentual angezeigt. E:T ratio: Verhältnis Effektor- zu Ziel-(Target)-zellen; Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch von fünf unabhängigen Experimenten.^[38]

Wie bei den zuvor untersuchten CD8+ CTL, konnte keine zytotoxische Aktivität der CD28- CTL gegenüber HLA-identen BLCL nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Somit hat sich bestätigt, dass die lytische Aktivität der CD8+/CD28- CTL Endothel-spezifisch sein musste und dass diese Endothel-spezifische Lyse durch die Zugabe von Treg-Zellen verstärkt wurde.

Die Verstärkung der lytischen Aktivität durch Treg-Zellen wurde nur bei direktem Zell-Zell-Kontakt zwischen Treg- und Effektorzellen nachgewiesen. Die indirekte Zugabe von Treg-Zellen in einem Transwell-System (Methode siehe Abschnitt 6.1.5), zeigte keine Auswirkung auf die lytische Aktivität von CD28- CTL (siehe Abbildung 26). Durch den fehlenden Effekt bei konventionellen CD28+ CTL bei Zugabe in der efferenten Phase, blieb die Frage offen, ob die Zugabe der Treg-Zellen in der afferenten Phase Konsequenzen auf die lytische Aktivität hätte. Wang et al. konnte in einem *in vitro* Model einer Haut-GvHD zeigen, dass die immunsupprimierende Funktion der Treg-Zellen gegen professionell Antigen-präsentierende Zellen zeitlich abhängig war^[40]. Die zeitlich unterschiedliche Zugabe der Treg-Zellen in der efferenten (Tag -1) bzw. in der afferenten Phase (Tag -7), hatte keine Auswirkung auf die Verstärkung der Treg-Zellen bei direktem Kontakt zu den CTL.

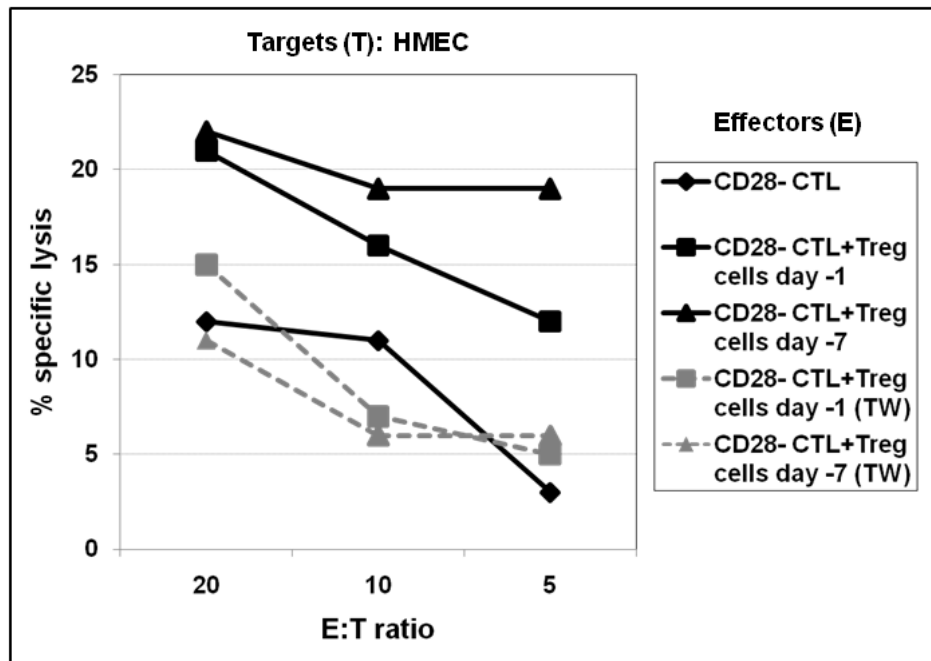


Abbildung 26: Die Zugabe von Treg-Zellen zu den CD8+/CD28- CTL im direkten Zell-Zell-Kontakt führt zu einer Erhöhung der lytischen Aktivität (schwarze Linien). Die Zugabe in einem Transwell (TW)-System, in dem kein direkter Kontakt zwischen Treg-Zellen und CTL möglich ist, führt zu keiner Verstärkung der lytischen Aktivität (graue Linien). Die spezifische Lyse wird prozentual angezeigt. E:T ratio: Verhältnis Effektor- zu Ziel-(Target)-zellen; Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch von drei unabhängigen Experimenten. ^[38]

Zur Verifizierung, dass die Zunahme der lytischen Aktivität durch die Treg-Zellen nicht CTL-Spender oder Zelllinien (HMEC) abhängig war, wurden weitere Versuche unter den gleichen Bedingungen mit anderen Zelllinien und primären Endothelzelllinien, wie z.B. HUVEC aus der Nabelschnurvene und Endothelzellen aus der menschlichen Vorhaut (Vorläufer der HMEC) durchgeführt (siehe Abbildung 27). Die vorherigen Ergebnisse konnten sowohl mit drei verschiedenen Spender CTL als auch mit fünf verschiedenen mikro- und makro-vaskulären Endothelzellen reproduziert werden.

CD28- CTL donor (initials)	Endothelial cell type				
	HMEC	PPEC ^a	HMVEC-L	EA.hy926	HUVEC
AA	n.d.	29	n.d.	70	15
GE	134	25	190	41	32
ZM	n.d.	n.d.	n.d.	70	68

Abbildung 27: Treg-Zellen von drei verschiedenen Spendern verstärken die lytische Aktivität von CD28- CTL, getestet mit fünf verschiedenen allogenen Endothelzelllinien. Die Erhöhung der spezifischen Lyse durch die Treg-Zellen ist in % angegeben (E:T Verhältnis 20:1), normalisiert auf die %-Lyse-Werte der CD28- CTL ohne Treg-Ko-Inkubation. PPEC: *primary human microvascular endothelial cells of foreskin (prepuce)*; HMVEC-L: *lung-derived human microvascular endothelial cells*; EA.hy926: *fusion product of HUVEC and A549 lung carcinoma cells (macrovascular)*; HUVEC: *primary human umbilical vein endothelial cells (macrovascular)*; n.d.: nicht durchgeführt ^[38]

6.3.2 Phänotypische Charakterisierung von CD8+ zytotoxischen T-Lymphozyten

Aufgrund der eindeutigen Unterscheidungen der CD28- und CD28+ CTL im Zytotoxizitätstest, wurden die beiden Subpopulationen auf weitere phänotypische Marker hin untersucht (siehe Abbildung 28).

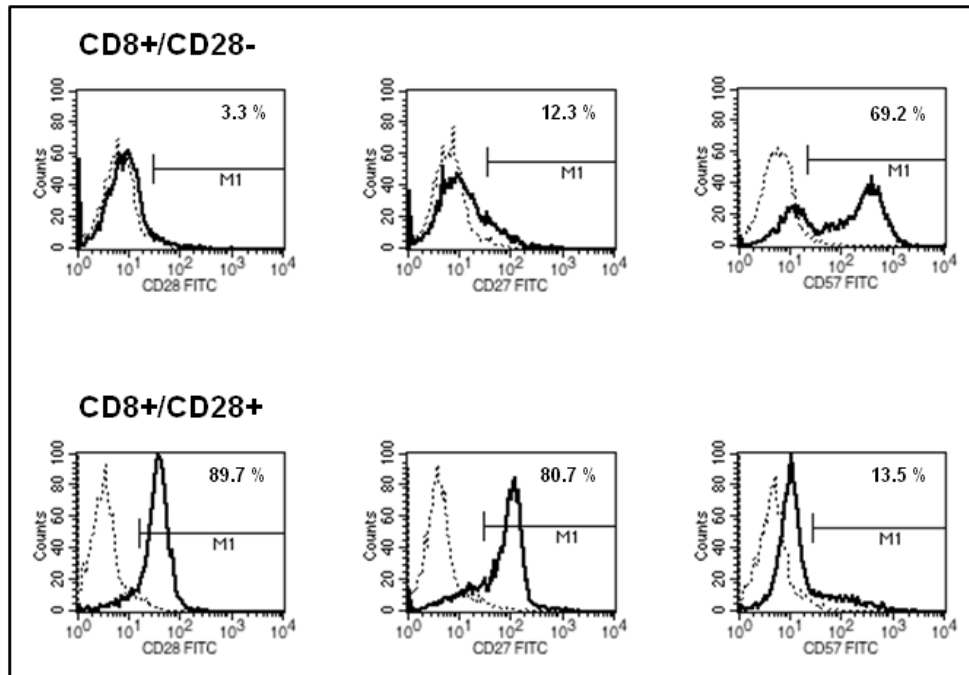


Abbildung 28: Phänotypische Analyse der CD8+/CD28- und der CD8+/CD28+ CTL auf die Oberflächenexpression von CD28, CD27 und CD57. Prozentuale Angabe der Marker-Expression jeweils oben rechts im Histogramm. Gestrichelte Linie: Isotyp; Schwarze Linie: spezifisches Antigen; FITC: Fluorescein Isothiocyanat; Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von fünf unabhängigen Experimenten.

Wie in Abbildung 28 zu sehen ist, exprimieren CD8+/CD28- CTL nur zu einem geringen Teil CD27 (12%) und zu einem Großteil CD57 (69%). Umgekehrt exprimieren CD8+/CD28+ CTL zu 80% CD27 und nur wenig CD57 (13%). Die Aktivierung von CD8+ T-Zellen erfolgt zunächst über die Erkennung und Bindung des CD3/T-Zell-Rezeptor-Komplexes an ein MHC-Klasse-I gebundenes Antigen. Erst durch ein weiteres ko-stimulierendes Signal werden die CTL aktiviert. Das am besten charakterisierte Moleküle auf T-Zellen ist CD28 mit den Liganden B7.1 (CD80)/ B7.2 (CD86). Die Ko-Stimulierung mit Endothelzellen als Antigen-präsentierende Zellen kann aber auch über andere Signalwege ablaufen. Aufgrund der fehlenden Expression des CD27 Rezeptors auf CD28- CTL konnte eine Ko-Stimulation über CD70/CD27 (TNF-Rezeptor der TNF/TNF-R Superfamilie) somit für die CD8+/CD28- CTL ausgeschlossen werden. Nach neueren Untersuchungen besitzen CD57+ T-Zellen ein hoch zytotoxisches Potential ^[41]. Zur näheren Charakterisierung der Effektorzellen wurden diese spezifisch auf die Expression von CD57 hin analysiert (siehe Abbildung 29).

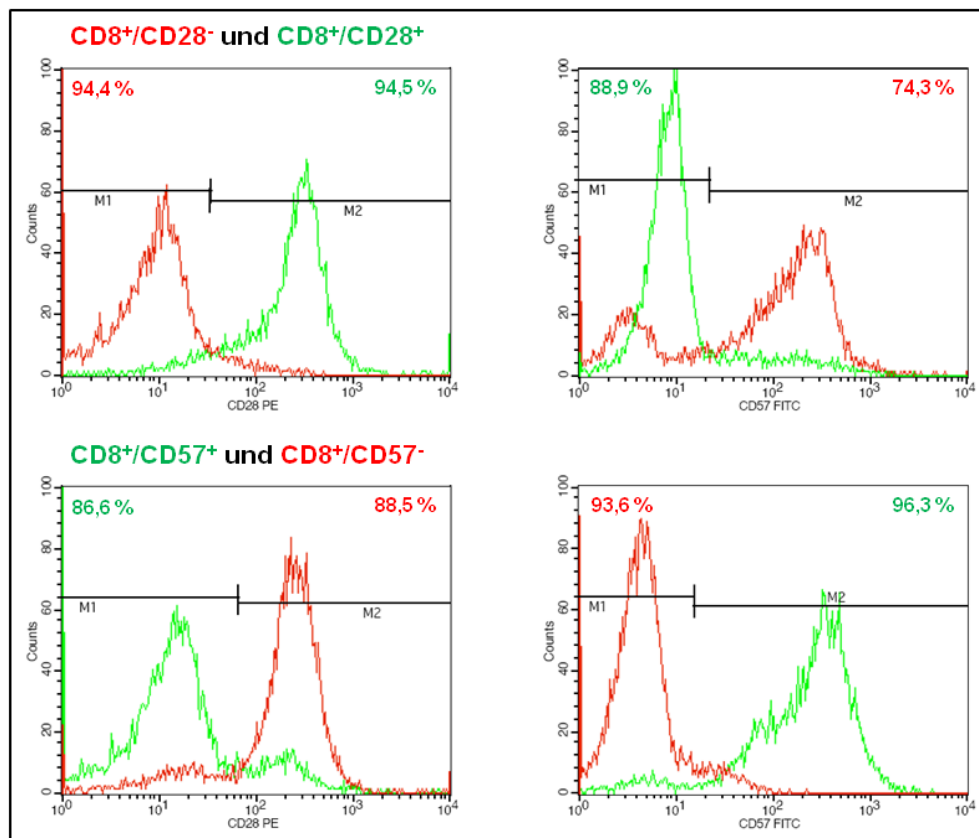


Abbildung 29: Phänotypische Analyse von CD8+/CD28- und CD8+/CD28+ CTL (obere Histogramme) bzw. CD8+/CD57+ und CD8+/CD57- CTL (untere Histogramme) auf die Oberflächenexpression von CD28 (linke Seite) und CD57 (rechte Seite). Prozentuale Angabe der jeweiligen Marker-Expression in den Ecken der Histogramme. PE: Phycoerythrin; FITC: Fluorescein Isothiocyanat; Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von sechs unabhängigen Experimenten.

Nach der Negativselektion von CD8+ CTL wurde entweder eine CD28 (siehe Abbildung 29, Histogramme oben) oder eine CD57 (siehe Abbildung 29, Histogramme unten) Positivselektion durchgeführt und die jeweiligen Positiv- und Negativfraktionen auf die Expression von CD28 und CD57 hin phänotypisch untersucht. Beide Isolierungsmethoden resultierten in einer durchschnittlichen Reinheit von 95% der jeweiligen Subpopulation von CD8+ CTL. Bei der Annahme, dass es sich bei den CTL, deren Endothel-spezifische Lyse durch die Zugabe von Treg-Zellen verstärkt wird, um CD8+/CD28-/CD57+ T-Zellen handelt, war die Aufreinigung über die CD57 Isolierung erfolgreicher (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Phänotypische Analyse von CD8+ CTL auf die Expression von CD28 und CD57 nach einer CD28 bzw. CD57 Positivselektion. Prozentuale Angabe der Oberflächenexpression der jeweiligen Marker. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von sechs unabhängigen Experimenten.

(%)	CD28-	CD57+
CD8+/CD28-	94,4	74,3
CD8+/CD28+	5,5	11,1
CD8+/CD57-	11,5	6,4
CD8+/CD57+	86,6	96,3

In diesem Beispiel (siehe Tabelle 3) erhielt man durch die Positivselektion von CD57 zu 87% die Subpopulation CD8+/CD57+/CD28-, hingegen resultierte die Selektion über CD28 nur zu 74% in der Subpopulation CD8+/CD28-/CD57+. Folglich war die Isolierungsvariante über den Marker CD57 zu 13% erfolgreicher um CD28-/CD57+ CTL zu erhalten. Sowohl CD8+/CD28+ als auch CD8+/CD57- CTL waren zu 89% negativ für CD57 bzw. positiv für CD28. Um einen genaueren Überblick über die einzelnen Populationen zu bekommen, wurden die Effektoren für CD28 und CD57 doppelt gefärbt (siehe Abbildung 30). Nach einer CD57 Isolierung zeigten 80% der CD57+ CTL den Phänotyp CD8+/CD57+/CD28- und 80% der CD57- CTL zeigten den Phänotyp CD8+/CD57-/CD28+. CD8+ CTL ließen sich demnach eindeutig in zwei Subpopulationen unterscheiden, den CD8+/CD28-/CD57+ und den CD8+/CD28+/CD57- CTL (siehe Abbildung 31).

Zur Bestimmung des Aktivierungsstatus der CTL wurden zudem direkt nach der Isolierung und nach einer 7-tägigen Stimulation mit Mitose-inaktivierten Endothelzellen (HMEC) die Oberflächenexpression weiterer Marker (CD45RA, CD45RO, CD166, CD278, CD279) untersucht. In Abbildung 31 ist das Expressionsmuster der Kombination von CD28 und CD45RO zu sehen, einem Marker für Gedächtnis- und aktivierte T-Zellen.

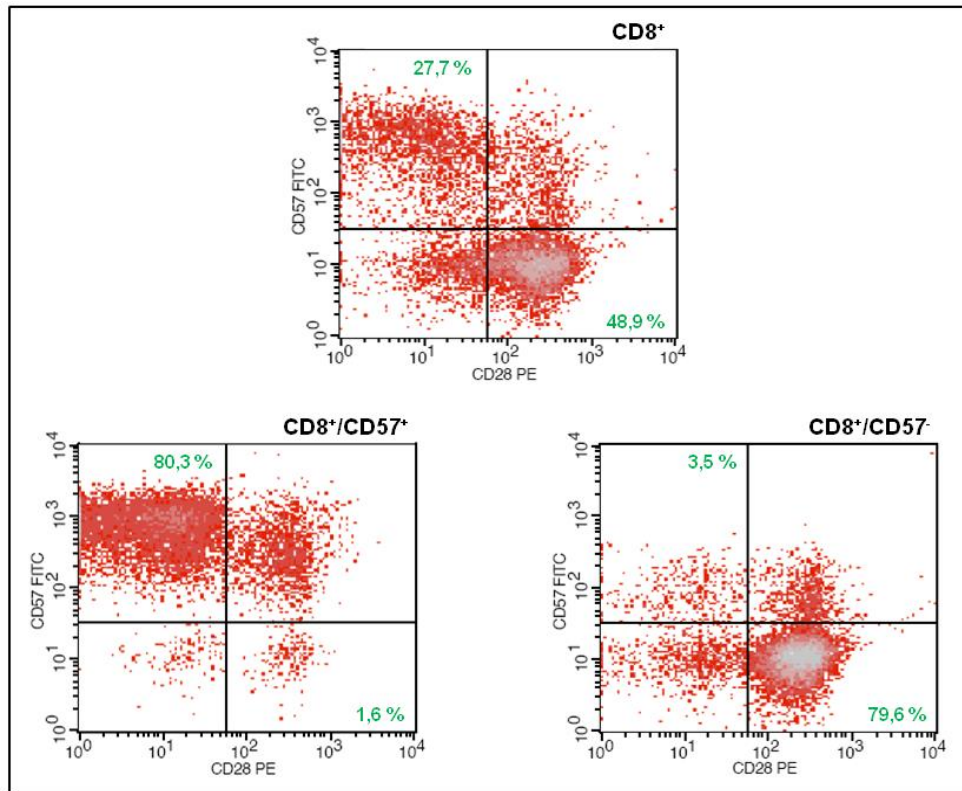


Abbildung 30: Phänotypische Analyse von CD8⁺ CTL (oberer DotPlot) bzw. CD8⁺/CD57⁺ und CD8⁺/CD57⁻ CTL (untere Dotplots) auf die Oberflächenexpression von CD28 und CD57 bei einer Doppelfärbung. Prozentuale Angabe der Marker-Expression in den Ecken der jeweils CD57⁺/CD28⁻ bzw. CD57⁻/CD28⁺ CTL. PE: Phycoerythrin; FITC: Fluorescein Isothiocyanat; Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

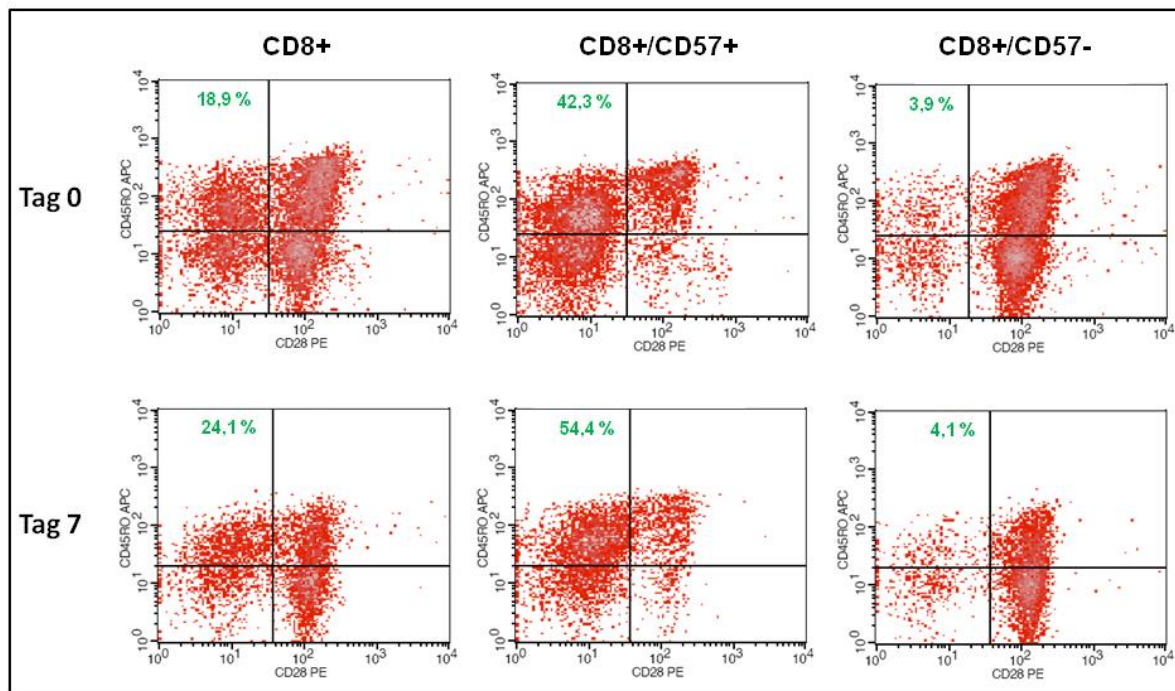


Abbildung 31: Phänotypische Analyse von CD8⁺ CTL (linke Dotplots) bzw. CD8⁺/CD57⁺ (mittlere Dotplots) und CD8⁺/CD57⁻ CTL (rechte Dotplots) auf die Oberflächenexpression von CD28 und CD45RO bei einer Doppelfärbung. Prozentuale Angabe der Marker-Expression in den Ecken der jeweils CD28⁻/CD45RO⁺ CTL. PE: Phycoerythrin; APC: Allophycocyanin; Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

Der Anteil an aktivierten CD45RO⁺ CTL stieg in den jeweiligen CD28- Subpopulationen der einzelnen CTL-Populationen (CD8⁺ bzw. CD8⁺/CD57⁺) in Laufe der 7-Tage-Kultur an. In den CD28⁺ Subpopulationen nahm der Anteil an CD45RO⁺ Zellen eindeutig ab. Die insgesamt Ausbeute an CD45RA⁺ CTL, einem Marker für naive T-Zellen, nahm deutlich ab (Daten nicht gezeigt). Die Expression von CD166, CD278 bzw. CD279 ergab keine wesentlichen Veränderungen durch die Stimulierung in den verschiedenen Subpopulationen an CTL (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine CD28⁺/CD57⁺ Subpopulation der CD8⁺ CTL für die Endothel-spezifische Lyse verantwortlich ist. Diese Subpopulation ähnelt dem Phänotyp voll ausgereifter, zytolytisch hochaktiver CTL ^[41]. In den folgenden Zytotoxizitätsanalysen wurde diese Annahme nochmals bestätigt und die Auswirkungen durch die Zugabe von Treg-Zellen zu den CD57⁺ Subpopulationen untersucht.

6.3.3 Treg-Zellen verstärken die lytische Aktivität von CD8⁺/CD28⁺/CD57⁺ CTL

Die positiv selektierten CD57⁺ CTL wurden mit mitose-inaktivierten Endothelzellen (HMEC) stimuliert und ihre lytische Aktivität im Zytotoxizitätstest nachgeprüft (siehe Abbildung 32). Wie bei den Ergebnissen zu den CD8⁺/CD28⁺ CTL wiesen auch CD8⁺/CD57⁺ CTL eine stärkere lytische Aktivität als CD8⁺ bzw. CD8⁺/CD57⁻ CTL auf.

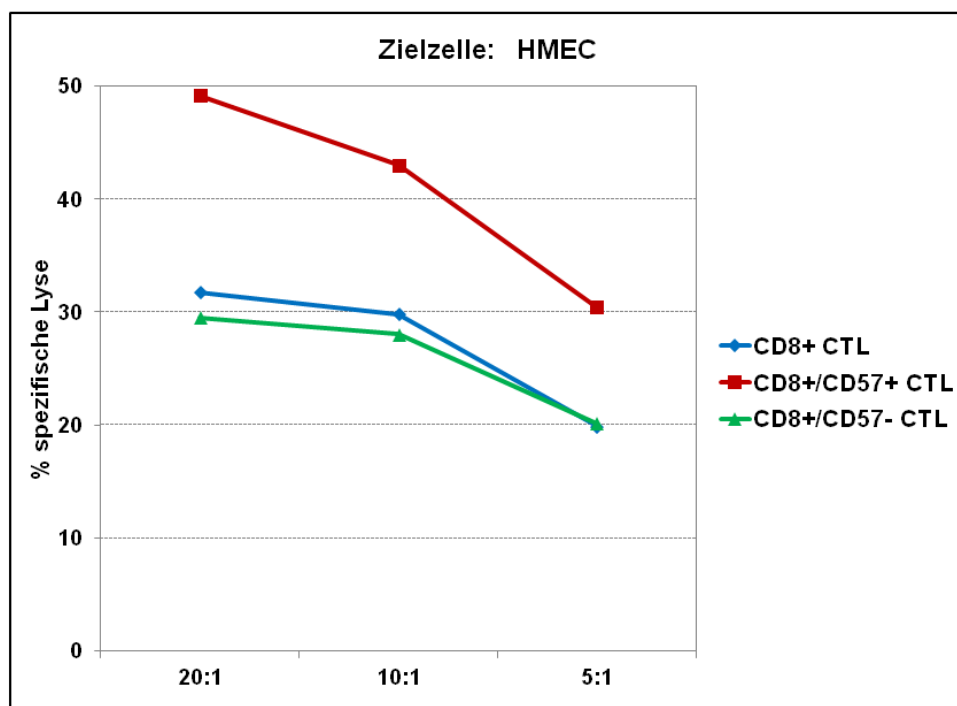


Abbildung 32: Die Endothel-spezifische Lyse CD8⁺ CTL (blaue Linie) wird durch die vorherige Aufreinigung CD8⁺/CD57⁺ (rote Linie) CTL deutlich gesteigert. CD8⁺/CD57⁻ CTL (grüne Linie) zeigen keine Verstärkung der Lyse, welche im Bereich von CD8⁺ CTL liegt. Die spezifische Lyse wird prozentual angezeigt. Das Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen war 20:1, 10:1 und 5:1. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch von drei unabhängigen Experimenten.

Im Folgenden wurden Treg-Zellen in der efferenten Phase der Stimulation zu den CD8+/CD57+ bzw. CD8+/CD57- CTL hinzugegeben und die Auswirkungen auf die zytotoxische Aktivität analysiert (siehe Abbildung 33). Wie bei den CD8+/CD28- CTL verstärkte die Zugabe der Treg-Zellen die Lyse der Endothelzellen durch CD8+/CD57+ CTL. Die Ko-Inkubation von CD8+/CD57- CTL mit Treg-Zellen führte hingegen wie bei den CD8+/CD28+ zu keiner Veränderung der lytischen Aktivität (Daten nicht gezeigt).

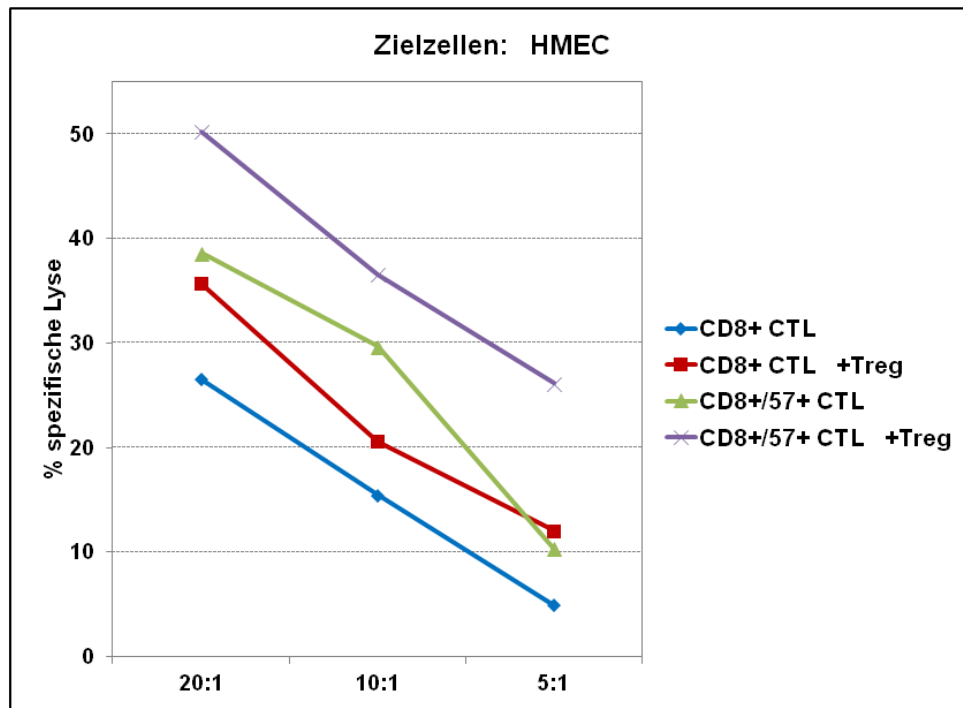


Abbildung 33: Die lytische Aktivität von CD8+ CTL (blaue Linie) wird durch die Zugabe von Treg-Zellen (rote Linie) verstärkt. Die vorherige Aufreinigung CD8+/CD57+ CTL (grüne Linie) steigert die endothel-spezifische Lyse. Wie bei den CD8+ CTL, kommt es durch die Ko-Kultur mit Treg-Zellen zu einer Erhöhung der lytischen Aktivität von CD8+/CD57+ CTL (lila Linie). Die spezifische Lyse wird prozentual angezeigt. Das Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen war 20:1, 10:1 und 5:1. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch.

Von diesen Daten ausgehend konnte eindeutig eine Endothel-spezifische CD8+/CD28-/CD57+ CTL Population nachgewiesen werden, welche in ihrer lytischen Aktivität durch die Zugabe von Treg-Zellen erheblich potenziert wurden.

6.3.4 Immunsuppressive Wirkung von UCMSC auf das vaskuläre Endothel

Im Hinblick auf den klinischen Einsatz von Treg-Zellen als Immuntherapeutikum sollte man, ausgehend von den vorherigen Ergebnissen, dabei zusätzlich auf einen speziellen Schutz des Endothels achten bzw. eine Alternative in Betracht ziehen. Im Abschnitt 6.1.4 wurden die immunsuppressiven Eigenschaften von UCMSC gegenüber CD4+ T-Helfer-Zellen innerhalb einer MLR nachgewiesen. Um die immunmodulatorischen Eigenschaften von UCMSC im Hinblick auf zytotoxische Effektorfunktionen am vaskulären Endothel zu untersuchen,

wurden diese in weiteren Zytotoxizitätstests, unter den gleichen experimentellen Bedingungen wie bei der Ko-Inkubation mit Treg-Zellen eingesetzt und die Auswirkung auf die zytotoxische Aktivität von CTL untersucht.

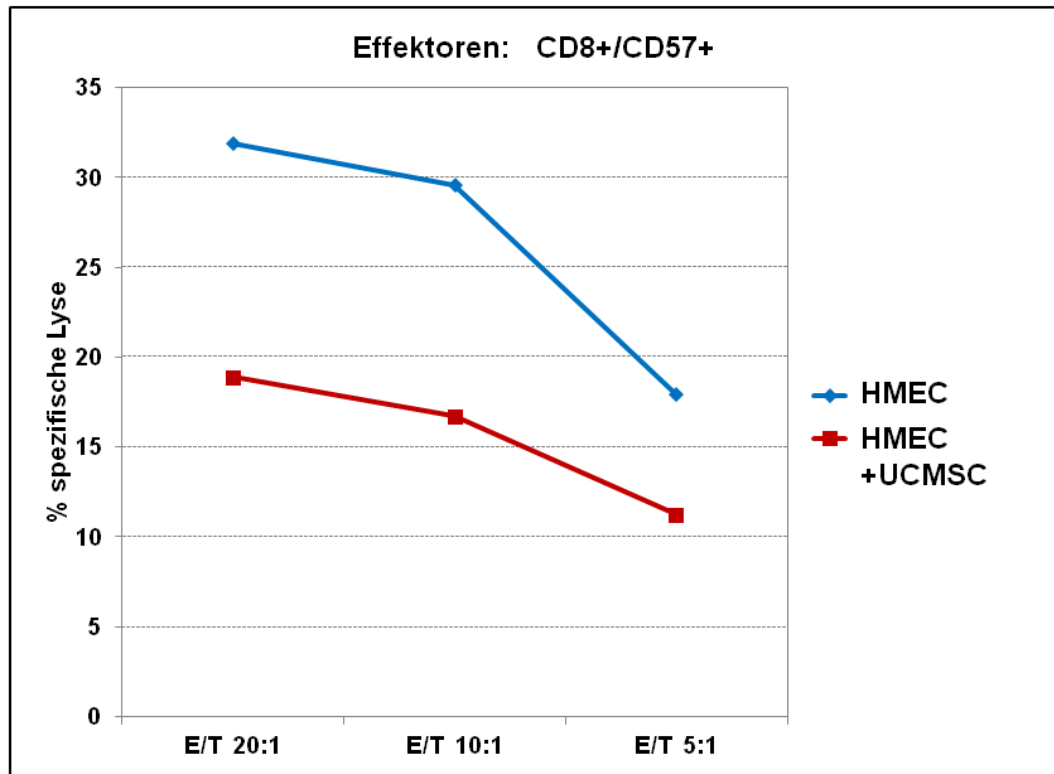


Abbildung 34: Die Endothel-spezifische Lyse CD8+/CD57+ CTL (blaue Linie) wird durch die Zugabe von UCMSC zu den Zielzellen (rote Linie) inhibiert. Die spezifische Lyse wird prozentual angezeigt. Das Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen war 20:1, 10:1 und 5:1. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch von drei unabhängigen Experimenten.

In Abbildung 34 ist zu sehen, dass das vaskuläre Endothel (HMEC) durch die Ko-Inkubation mit UCMSC (WJC), vor der endothelspezifischen Lyse durch CD8+/CD57+ CTL geschützt wurde.

6.4 eUCMSC im Zytotoxizitätstest

Wie im Abschnitt 6.1.3 beschrieben ist es möglich, UCMSC in Endothel-ähnliche Zellen (eUCMSC) zu differenzieren. Es war anzunehmen, dass eUCMSC genauso wie HMEC oder andere primäre Endothelzellen (siehe Abbildung 27) als APC fungieren würden und dadurch im Zytotoxizitätstest einsetzbar wären. Zur Überprüfung dieser These wurden CD8+ CTL wie bei den Versuchen mit der HMEC mit mitose-inaktivierten eUCMSC stimuliert. Die eingesetzten eUCMSC wurden wie beschrieben zwei Wochen vor dem Ansatz des Experimentes in endotheliale Richtung differenziert.

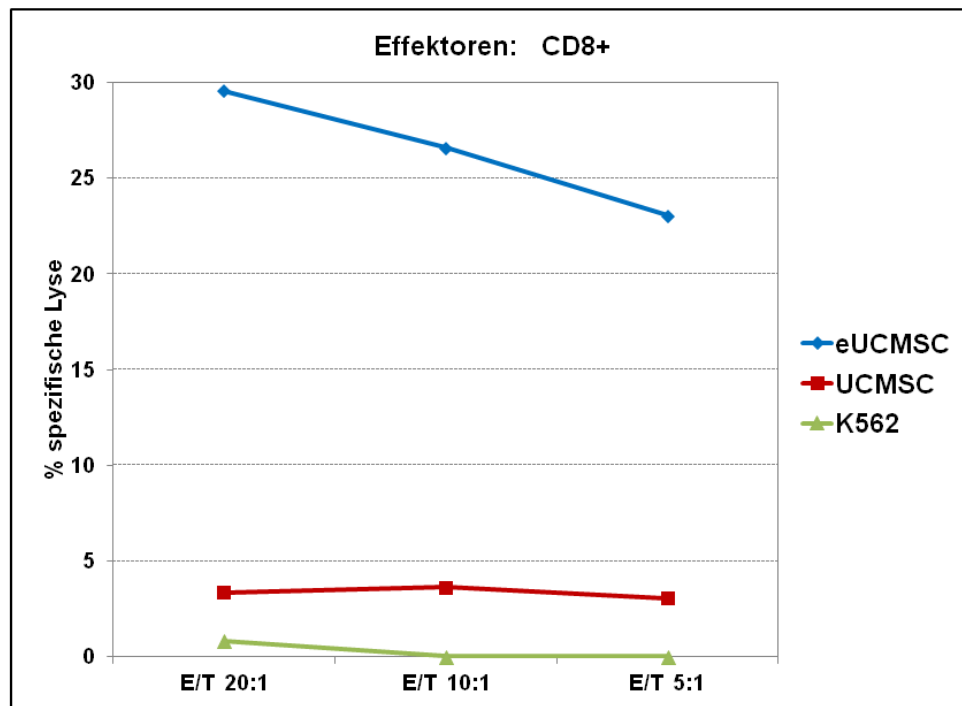


Abbildung 35: Zytotoxizitätstest. CD8+ CTL, mit Endothel-differenzierten UCMSC stimuliert, zeigten eine Endothel-spezifische lytische Aktivität (blaue Linie). Als Negativkontrollen wurden undifferenzierte UCMSC als Zielzellen (rote Linie) und K562 (grüne Linie) eingesetzt. Die spezifische Lyse wird prozentual angezeigt. Das Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen war 20:1, 10:1 und 5:1. K562: *Human erythromyeloblastoid leukemia cell line*. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch von zwei unabhängigen Experimenten.

In diesem Versuch (siehe Abbildung 35) konnte eine spezifische Lyse von CD8+ CTL gegenüber eUCMSC nachgewiesen werden. Undifferenzierte UCMSC und K562 wurden nicht von den CTL lysiert. Es gab keinen Unterschied in der zytotoxischen Aktivität der CD8+ CTL zum Ansatz mit der Endothelzelllinie (HMEC). Genauso wie HMEC fungierten auch eUCMSC als Antigen-präsentierende Zellen. Es wäre demzufolge denkbar Patientenspezifische Endothelial-differenzierte UCMSC zu generieren und diese theoretisch für ein *post-transplant in vitro Monitoring* Endothel-spezifischer Alloreaktionen in Zytotoxizitätstests einzusetzen.

6.5 Pharmakologischer Schutz des vaskulären Endothels

Defibrotide (DF) ist ein polydisperses Gemisch aus 90% einzelsträngigen Polydesoxyribonukleotiden, das anti-thrombotisch, anti-ischämisch und pro-fibrinolytisch wirkt ^[42]. In der Literatur ist beschrieben, dass DF die Apoptose induzierende und proinflammatorische Wirkung von Fludarabin (F-Ara) am Endothel unterbinden kann ^[43]. F-Ara ist ein nicht-myeloablatives Immunsuppressivum zur Konditionierung vor Stammzelltransplantation. Die bekannte schützende Wirkung von DF auf F-Ara stimulierte

HMEC (siehe Abbildung 36 A) konnte erstmals auch für eUCMSC nachgewiesen werden (siehe Abbildung 36 B).

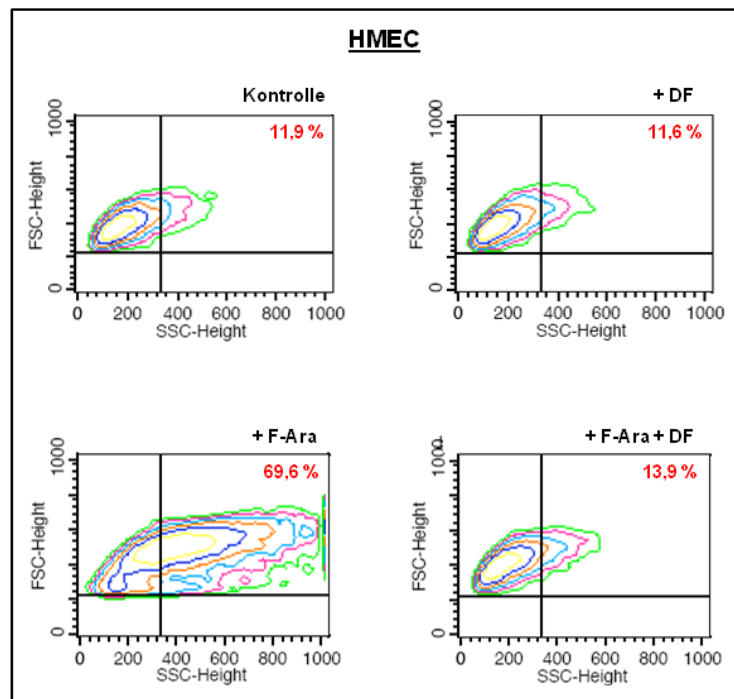


Abbildung 36 A: Durchflusszytometrische Analyse. HMEC wurden ohne (oben links), mit Zugabe von DF (oben rechts) oder / und F-Ara (unten) für 48 Stunden inkubiert und die Apoptose über die Zunahme der Granularität (SSC) gemessen. Die Ergebnisse sind prozentual angegeben. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch.

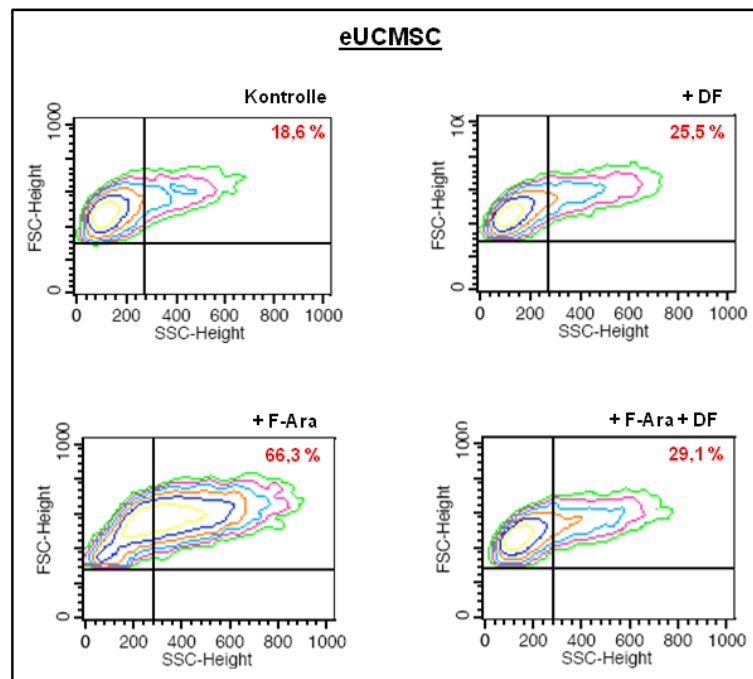


Abbildung 36 B: Durchflusszytometrische Analyse. eUCMSC wurden ohne (oben links), mit Zugabe von DF (oben rechts) oder / und F-Ara (unten) für 48 Stunden stimuliert und die Apoptose über die Zunahme der Granularität (SSC) gemessen. Die Ergebnisse sind prozentual angegeben. Gezeigt ist ein einzelner Versuch.

In Abbildung 37 wurden sowohl HMEC als auch eUCMSC nach entsprechender Stimulation auf die Oberflächenexpression von CD54 (ICAM-1) und MHC-Klasse-I hin untersucht. Sowohl CD54 als auch MHC-Klasse-I werden bei Entzündungsreaktionen von aktivierten Endothelzellen verstärkt exprimiert.

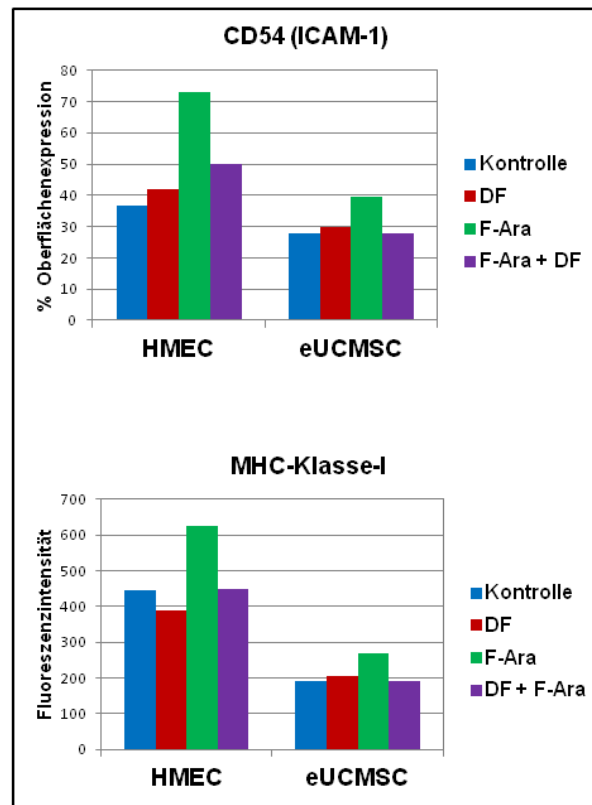


Abbildung 37: Durchflusszytometrische Analyse. HMEC und endothelial differenzierte UCMSC wurden ohne (blau), mit Zugabe von DF (rot) oder / und F-Ara (grün / lila) für 24 Stunden stimuliert und auf die Expression von CD54 (oberes Diagramm) und MHC-Klasse-I (unteres Diagramm) hin untersucht. Die Oberflächenexpression wird prozentual (CD54) bzw. anhand der Fluoreszenzintensität (MFI, MHC-Klasse-I) angezeigt. Gezeigt ist ein einzelner Versuch.

Durch die Zugabe von F-Ara zu den HMEC bzw. zu den eUCMSC, wurden diese inflammatorisch aktiviert und exprimierten jeweils 50% bzw 30% mehr CD54 im Vergleich zu den nicht stimulierten oder den mit DF inkubierten Zellen. Wie erwartet wurden auch im gleichen Maße MHC-Klasse-I Moleküle verstärkt exprimiert. In beiden Fällen konnte durch die gleichzeitige Zugabe von DF zu den mit F-Ara simulierten Zellen, die Wirkung von F-Ara revidieren. Ausgehend von den gezeigten Daten, wäre neben dem Einsatz von Treg-Zellen in der Zelltherapie die zusätzliche Verabreichung von DF bzw. UCMSC als Endothel-Schutz möglich.

7 Diskussion

Das Nabelschnurgewebe ist eine leicht zugängliche Quelle für mesenchymale Stammzellen (UCMSC). Im Vergleich zu adulten Stammzellenquellen, wie z.B. MSC aus dem Knochenmark (BMMSC), ist kein schmerzhafter operativer Eingriff zur Gewinnung der Stammzellen notwendig. Es besteht keine Gefahr einer Infektion, Blutung oder chronischer Schmerzen durch die Entnahme der Zellen. UCMSC sind ontogenetisch primitiver als BMMSC und gleichen in ihren Proliferations- und Differenzierungsfähigkeiten eher embryonalen Stammzellen (ESC). Gegenüber ESC ist die Verwendung von UCMSC nicht aus ethischen und juristischen Gründen limitiert. Nach dem Embryonenschutzgesetz (EschG vom 13.12.1990) ist die Isolierung von ESC in Deutschland verboten, da die Gewinnung der ESC aus nicht implantierten „überzähligen“ Embryonen von *in-vitro*-Fertilisationen, die Zerstörung der verwendeten Embryonen zur Folge hat. Die Isolierung der UCMSC erfolgt nach entsprechender Einverständniserklärung der Mutter aus dem Nabelschnurgewebe, einem „Material“ das nach der Geburt ansonsten in der Klinik verworfen wird. Klinisch sind UCMSC wie auch andere MSC für die Immunrekonstitution nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation ^[44] und für die Immunmodulation bzw. Verhinderung einer Spender-gegen-Wirt-Reaktion (GvHD) ^[45] interessant, weil sie durch ihre geringe Immunogenität für einen allogenen Einsatz (auch *3rd party*) in Frage kommen. Hinzu kommt, dass UCMSC im Vergleich zu anderen MSC auch unter inflammatorischen Bedingungen noch immunsuppressive Eigenschaften besitzen ^[46].

MSC werden auch bei der Züchtung von Geweben und Organen, dem sogenannten *Tissue Engineering* ^[47,48] eingesetzt, um körpereigene Regenerationsvorgänge zu aktivieren oder das geschädigte Gewebe durch ein Gewebeimplantat zu ersetzen. Es ist möglich, die MSC im Körper an den Ort des Krankheitsgeschehens zu bringen, indem man die Zellen zum einen direkt in das erkrankte Organ oder Gewebe transplantiert, um die Regenerationsprozesse zu unterstützen, oder zum anderen das Stammzellpräparat venös verabreicht. Es ist generell möglich, Stammzellen undifferenziert und differenziert bzw. in einer Zellsuspension oder auch mit einem dreidimensionalen Konstrukt auf Trägermaterialien, so genannten *Scaffolds*, in einen Organismus zu bringen. Die notwendige *in vitro* Expansion und Differenzierung von MSC ist in Medium mit fötalem Kälberserum (FCS) heute eine etablierte Methode ^[49,50]. Für den klinischen Einsatz ist es aber unabdingbar, MSC ohne tierische Komponenten zu kultivieren, da Stammzellen, die zur Zellersatztherapie eingesetzt werden, als Arzneimittel gelten und somit dem Arzneimittelgesetz (AMG) mit den entsprechenden GMP (*good manufacturing practice*) Richtlinien unterliegen. Daher wurden in dieser Arbeit MSC aus dem Nabelschnurgewebe isoliert und von vorn herein unter GMP- im Vergleich zu Standard-Bedingungen kultiviert, expandiert und die gewonnenen Zellen auf ihre phänotypischen und funktionellen

Eigenschaften hin untersucht. Die UCMSC ließen sich sowohl aus der Wharton'schen Sulze (WJC), als auch aus der perivaskulären Region der Arterien (PVSC) isolieren^[19] und wurden zunächst separat überprüft. In Studien mit UCMSC wird allgemein nur mit einer der beiden Populationen gearbeitet oder es werden vergleichende Experimente unter MSC verschiedenen Ursprungs durchgeführt^[51,24,52]. Einen systematischen Vergleich zwischen WJC und PVSC gab es noch nicht. Da bei allen Versuchen in unserem Labor zur Morphologie, zum Phänotyp und zu den funktionellen Eigenschaften kein Unterschied zwischen WJC und PVSC feststellbar war, wurden die Zellen einheitlich als UCMSC in den Folgeversuchen eingesetzt, aber niemals zusammen gemischt. Die Ausbeute an erfolgreichen Isolierungen unter Standard-Bedingungen mit FCS-haltigem Medium^[19] war im ersten Zeitraum sehr gering, nur die Hälfte aller Isolierungen resultierte in passagierbaren UCMSC. Erst durch die GMP-Kultur von MSC konnte die Erfolgsquote der Isolierungen auf über 90% gesteigert werden und somit die Grundvoraussetzung für einen klinischen Einsatz der Zellen geschaffen werden^[53]. Der klinische Einsatz von UCMSC in der Zelltherapie scheint gegenüber BMMSC von Vorteil, da in anderen Arbeiten mit BMMSC^[54] kein Unterschied bei der Proliferation der Zellen zwischen GMP-Kultur und herkömmlicher FCS-Kultur nachweisbar war. In unserem Labor proliferierten UCMSC unter GMP-konformen Kulturbedingungen doppelt bis dreifach so schnell wie Zellen in Standardkultur. Hinsichtlich ihrer Morphologie, dem spindelförmigen, Fibroblasten-ähnlichen Aussehen, als auch in ihrer Fähigkeit in verschiedene Zellen mesenchymalen Ursprungs zu differenzieren, wie z.B. Adipozyten, Chondrozyten und Osteozyten^[55,56,57], konnten keine Unterschiede in den unterschiedlichen Kulturen festgestellt werden. Bei einem Arzneimittel stellen sich grundsätzlich zwei Fragen, die nach der Wirksamkeit und die nach der Sicherheit. Erste klinische Tierversuche zeigten, dass es beim Einsatz von BMMSC teilweise zu unkontrollierten Maldiifferenzierungen kommen kann^[58,59]. Erste Tierversuche mit UCMSC hingegen sprechen für den *in vivo* Einsatz von UCMSC anstelle von BMMSC, da es bislang keine Hinweise auf Fehldifferenzierung oder Teratombildung gab^[60]. Eine weitere Grundvoraussetzung ist die Kryokonservierbarkeit der MSC. Es ist bewiesen, dass UCMSC auch nach mehreren Einfrier-/Auftauzyklen im Gegensatz zu anderen adulten MSC, z.B. BMMSC, ein wesentlich höheres Proliferations- und Expansionspotential besitzen^[20]. Eine höhere Differenzierungskapazität (CFU-F, *colony forming units – fibroblasts*)^[61] konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Eine Einlagerung der UCMSC nach der Geburt des Kindes wäre möglich. Seit 1992 gibt es in Deutschland öffentliche und kommerzielle Blutbanken zur Kryokonservierung von Nabelschnurblut. Im Falle einer späteren Erkrankung stehen somit die eigenen Stammzellen zur Immuntherapie zur Verfügung oder können bei öffentlichen Gewebebanken im Bedarfsfall auch einer allogenen Spende zugeführt werden. Aus dem Nabelschnurblut können neben hämatopoetischen Stammzellen (HSC) auch MSC

gewonnen werden. Die Erfolgsquote beim Isolieren von MSC aus dem Nabelschnurblut, im Vergleich zu MSC aus dem Knochenmark, liegt bei etwa 63% ^[62,63] und somit auch deutlich unter der Erfolgsquote von 90% bei den UCMSC. Aus dem Nabelschnurblut werden daher hauptsächlich HSC isoliert und klinisch eingesetzt. Bei einer Transplantation von HSC werden ca. 3×10^7 Zellen pro kg Körpergewicht eingesetzt. Im Durchschnitt können bei einer Spende von etwa 60 ml Nabelschnurblut ungefähr eine Anzahl an 5×10^8 nukleären Zellen gewonnen werden ^[64]. Zurzeit werden diese Stammzellpräparate daher nahezu ausschließlich in der Leukämietherapie bei Kindern mit maximal 30-40 kg Körpergewicht eingesetzt, da für einen Erwachsenen mit 75 kg Gewicht im Durchschnitt $2,25 \times 10^9$ HSC benötigt würden. Abhängig von der Ausbeute der Primärkultur und aufgrund ihrer schnellen Proliferationsrate mit kurzen Zellzyklen, ist es bei UCMSC möglich bereits nach zwei bis drei Passagen MSC in dieser Größenordnung zu gewinnen. Für die *in vitro* Arbeiten mit MSC ist eine GMP-Kultur nicht notwendig und verursacht unnötig hohe Kosten. Eine alternative Methode zur FCS-haltigen Zellkultur wäre der Einsatz von „*Platelet-derived growth factors*“ (PDGF), welche bei der Wundheilung eine wesentliche Rolle spielen. Versuche mit BM MSC führten durch die Zugabe von pHPL (*pooled human platelet lysate*) zu einer verstärkten Proliferation der Zellen, ohne deren Phänotyp zu verändern oder Auswirkungen auf die Differenzierungsfähigkeit zu haben ^[65,66]. Eine Wirkung von pHPL auf UCMSC ist nicht auszuschließen und könnte somit auch Einfluss auf die Proliferation, Differenzierung und Immunsuppression von UCMSC haben. Bisher liegen dazu keine Arbeiten vor. Grundsätzlich kam es durch die verschiedenen Kulturbedingungen zu keiner Veränderung des Phänotyps der UCMSC, charakterisiert anhand eines Antigenmusters, das sowohl mesenchymale, endotheliale als auch epitheliale Anteile enthält ^[67], da die Expression eines einzelnen spezifischen Oberflächenmarkers nicht gegeben ist ^[68,69]. Ein tatsächlicher Nachweis, dass es sich um mesenchymale Stammzellen gehandelt hat, wurde aber erst durch ihre Plastizität erbracht. Die funktionelle Charakterisierung erfolgte durch den Nachweis ihrer immunsuppressiven Eigenschaften. Es konnte gezeigt werden, dass UCMSC, ebenso wie BM MSC, in Gegenwart einer allogenen MLR (gemischten Lymphozytenreaktion) die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen inhibieren konnten ^[25,70]. Es ist bekannt, dass UCMSC anti-inflammatorische Moleküle exprimieren ^[71,72]. Allerdings ist für die Expression von anti-inflammatorischen Faktoren die Aktivierung der UCMSC durch den Kontakt mit anderen Zellen notwendig. Mittels ELISA Analysen der Zellkulturüberstände wurde festgestellt, dass nur in Ko-Kulturen von UCMSC und einer MLR Prostaglandin E₂ (PGE₂) nachweisbar war. Dies stimmt mit Untersuchungen überein, dass im konditionierten Medium von unstimulierten UCMSC keine immunsuppressiven Faktoren nachweisbar sind ^[73]. Erst durch die Stimulation mit pro-inflammatorischen Molekülen, wie z.B: IFN- γ , TNF- α , IL-1- α und IL-1- β , werden MSC zur Produktion von Chemokinen angeregt ^[74]. Vorstimulierte MSC weisen einen höheren

Effekt auf ^[46] und bestätigen somit, dass eine inflammatorische Umgebung notwendig ist, um die MSC zur Produktion von anti-inflammatorischen Faktoren anzuregen. Erst durch das Vorhandensein einer ausreichenden Menge an proinflammatorischen Zytokinen werden MSC zur Produktion von anti-inflammatorischen Molekülen stimuliert und können immunsupprimierend wirken ^[75]. Die exakten molekularen Mechanismen, die zur inhibitorischen Wirkung von MSC führen, sind noch nicht geklärt. Es ist wichtig zu untersuchen, welche Marker bzw. Zytokine standardmäßig exprimiert werden und welche erst durch die Stimulation von T-Zellen bzw. bestimmten Zytokinen hochreguliert werden. In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass MSC auch die Proliferation von Lymphozyten begünstigen können, wenn keine ausreichende Stimulierung vorliegt ^[75,76]. Die inflammatorische Umgebung ist somit entscheidend für die Funktionsweise von MSC. Allerdings wird der MSC-vermittelte inhibitorische Effekt zwischen verschiedenen Spezies unterschiedlich reguliert ^[77]. Die verschiedenen Bedingungen, die in unterschiedlichen Stimulierungen von MSC resultieren, machen es dadurch schwierig einen entscheidenden Faktor der inhibitorischen Wirkung von MSC zu bestimmen. Der immunsuppressive Effekt von UCMSC kann von verschiedenen Faktoren abhängig sein. Die Stimulierung von MSC mit IFN- γ in Kombination mit anderen Faktoren (TNF- α , IL-1- α oder IL-1- β) führt zur Exprimierung von z.B. iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) ^[75] und IDO (*indoleamin 2,3-dioxygenase*) ^[36]. Stickstoffmonoxid (NO, *nitric oxide*) kann in hohen Konzentrationen die T-Zell-Rezeptor-vermittelte T-Zell Aktivierung, deren Proliferation und Zytokin-Produktion hemmen ^[78,79]. NO exprimierende MSCs inhibieren die T-Zell Proliferation durch die Blockierung der STAT5 Phosphorylierung ^[80]. Es ist bekannt, dass IDO die T-Zell Proliferation bzw. Aktivierung durch die Degradierung von Tryptophan zu Kynurenine und der Ausschüttung von pro-apoptotischen Faktoren hemmt ^[81,82,83]. IDO wird durch Enzyminhibitor 1-MT (1-Methyltryptophan) blockiert ^[84]. Erste Versuche zeigten, dass die Zugabe von 1-MT die inhibitorische Wirkung von stimulierten UCMSC zum Teil aufhob. Es konnte zudem gezeigt werden, dass andere lösliche Faktoren wie PGE₂ ebenso eine wesentliche Rolle bei der Inhibierung durch UCMSC spielen. Durch den Einsatz von Indomethacin (Indo) in einer Ko-Kultur von UCMSC mit einer allogenen MLR, wurde der inhibitorische Effekt von UCMSC zu einem Großteil aufgehoben. Indo ist ein Cyclooxygenase-2 (COX-2) Inhibitor und verhindert die Synthese von PGE₂ aus Arachidonsäure mittels Cyclooxygenasen ^[85]. Bei der Reifung von dendritischen Zellen konnte ebenso eine entscheidende inhibierende Beeinflussung durch PGE₂ festgestellt werden. In Anwesenheit von PGE₂ kam es zu einer verstärkten Expression von IDO und löslichem CD25 und im weiteren zur T-Zell Inhibierung ^[86]. Ein ähnliches Zusammenspiel von PGE₂ und IDO wäre bei der Inhibierung durch UCMSC möglich, müsste aber erst noch experimentell verifiziert werden. Da es nie zu einer kompletten Aufhebung des Effektes kam, könnten aber auch weitere Faktoren an der

Immunsuppression beteiligt sein, wie z.B. TGF- β (*transforming growth factor β*) oder Interleukin 10. Versuche mit MSC aus dem Amnion zeigten, dass MSC in Ko-Kultur mit PBMC neben PGE₂ und IDO auch TGF- β exprimieren ^[87]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass UCMSC neben adulten Stammzellquellen, wie z.B. BMMSC oder regulatorischen T-Zellen ein sehr vielversprechendes Immuntherapeutikum darstellen.

Bei der Allotransplantation solider Organe und hämatopoetischer Stammzellen stellt das vaskuläre Endothel die primäre Zielstruktur transplantationsassoziierter Komplikationen dar und geht dem eigentlichen Epithelschaden voraus ^[88]. Der Schaden am Endothel läuft in einem 3-Stufen-Prozess ab ^[89], der auch die Konditionierung vor Transplantation umfasst ^[8]. Folglich kommt es so zur Proliferation und Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen (CD8+ CTL), welche am Entzündungsort die Endothelzellen zerstören. Wie bereits erwähnt, wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Eißner einschlägige *in vitro* und *in vivo* Vorerfahrungen mit dem Einfluss der Konditionierung auf den Aktivierungszustand und die Vitalität des Endothels gemacht ^[90,91,92,93]. Studien zeigen, dass regulatorische T-Zellen (Treg-Zellen) recht vielversprechend in der adjuvanten Immuntherapie zur Toleranzinduktion sind, z.B. zur Behandlung der akuten „*graft-versus-host-disease*“ (GVHD) nach allogener Stammzelltransplantation. CD4+/CD25+/FoxP3+ Treg-Zellen können die Aktivierung konventioneller FoxP3- T-Zellen inhibieren oder auch die Antigen-präsentierende Funktion der Zielzellen negativ beeinflussen. Der Einfluss von Treg-Zellen auf die Wirkung von CD8+ CTL gegenüber vaskulären Endothelzellen wurde bisher noch nie thematisiert oder untersucht. In dieser Arbeit wurden aber eindeutige Ergebnisse zu dieser Fragestellung erbracht, die entscheidende Bedenken für den alleinigen Einsatz von Treg-Zellen als Immuntherapeutikum geben. Zur Bearbeitung der Fragestellung wurden die Treg-Zellen zunächst isoliert und mittels CD3/CD28 Dynabeads[®] expandiert. Um sicherzustellen, dass die Expansion mittels der Beads die immunsupprimierende Wirkung der Treg-Zellen nicht verändert hat, wurden die Treg-Zellen vor dem Einsatz in Zytotoxizitätstests durch phänotypische und funktionelle Untersuchungen charakterisiert. Die Treg-Zellen konnten durch ihre Markerexpression von CD4+/CD25+/FoxP3+ und anderen in der Literatur beschriebenen Markern identifiziert werden ^[37]. Es gab keine Abweichung zu dem bekannten Expressionsmuster von Treg-Zellen. Die Treg-Zellen konvertierten durch die Expansion auch nicht zu konventionellen T-Zellen, zu keinem Zeitpunkt konnte eine IL-2 (Interleukin-2) Expression nachgewiesen werden ^[38]. Zur funktionellen Charakterisierung wurden Treg-Zellen hinsichtlich ihrer immunologischen Eigenschaften gegenüber CD4+ T-Zellen in einem Proliferationsversuch, innerhalb einer allogenen MLR untersucht. Alle durchgeführten funktionellen Tests wiesen die völlig intakte immuninhibitorische Funktionsfähigkeit der verwendeten Treg-Zellen nach. Dennoch wurde eindeutig nachgewiesen, dass durch die Zugabe von Treg-Zellen zu einer Ko-Kultur von CD8+ bzw. CD8+/CD28-/CD57+ CTL und

Mitose-inaktivierten Endothelzellen (HMEC), die lytische Aktivität der CTL verstärkt wurde. Dieser Effekt der Verstärkung war auch bei endothelialen Primärkulturen verschiedenen Ursprungs (Haut, Lunge, Nabelschnur) nachweisbar und stellte somit nicht nur das Artefakt einer immortalisierten Zelllinie dar. Eine Beteiligung professioneller Antigen-präsentierender Zellen (APC) war in den Versuchen nicht erforderlich ^[94,95], das Endothel stellte ein direktes Ziel für die CTL dar. HLA-idente BLCL wurden nicht durch zuvor Endothelial-stimulierte CTL lysiert. Mit diesen Versuchen wurde unwiderlegbar nachgewiesen, dass Treg-Zellen neben ihren bekannten immunsuppressiven Funktionen auch eine bisher noch nicht bekannte immunstimulierende Wirkung haben können. Dies ist von besonderer Wichtigkeit in Bezug auf den Einsatz von Treg-Zellen als Immuntherapeutikum, da es zu schweren Nebenwirkungen kommen kann. Bisher wurde noch nicht speziell untersucht, in welchem Maße sich das phänotypische Expressionsmuster bzw. die funktionellen Eigenschaften von Treg-Zellen bei Kontakt mit anderen Immunzellen verändern. Daher sollten diese Charakteristika der Treg-Zellen nicht nur vor dem Einsatz in Zytotoxizitätsanalysen, sondern auch danach bestimmt werden. Generell, sind bei den phänotypischen Untersuchungen der prozentuale Anteil und die Antigendichte der FoxP3 (*forkhead box P3*) Expression von besonderem Interesse. FoxP3 ist ein essentieller Transkriptionsfaktor bei der Entwicklung und der späteren immunsuppressiven Funktion von regulatorischen T-Zellen ^[28]. Neben den beschriebenen Markern, sind andere Marker in Korrelation zur FoxP3 Expression zu beachten. Es gibt Befunde, dass die CD44 Expression in Zusammenhang mit der FoxP3 Expression steht. CD44 ist ein Rezeptor für Hyaluronsäure und scheint eine Rolle bei der T-Zell-Entwicklung zu spielen. Da auch CD44 und FoxP3 miteinander verknüpft sind, wäre eine entsprechende Auswirkung von CD44 auf die suppressive Wirkung der Treg-Zellen nicht auszuschließen ^[96]. Zusätzlich zu den bisher genannten Markern sollte auch die TNFR2 Expression beachtet werden. Es konnte gezeigt werden, dass humane CD4+/CD25+/TNFR2+ T-Zellen zu 100% FoxP3+ sind und die suppressivste Untereinheit von Treg-Zellen darstellen. Gleichzeitig zeigten CD4+/CD25+/TNFR2- T-Zellen keine inhibitorische Funktion ^[97]. Wie bei den MSC konnte die allgemeine inhibitorische Funktion der Treg-Zellen in Versuchen bestätigt werden. Allerdings könnte wie bei den MSC die suppressive Wirkung der Treg-Zellen von der inflammatorischen Umgebung abhängig sein. Zur genaueren Aufklärung des Wirkmechanismus von Treg-Zellen wäre es zukünftig notwendig, sowohl aus der Reinkultur als auch aus den Mischkulturen der CFSE-Analysen und auch aus den Zytotoxizitätstests immer Proben der Überstände zu sammeln und auf ihren Gehalt regulatorischer und inflammatorischer Zytokine mittels ELISA-Analysen zu untersuchen. Die Analyse der CD8+ CTL zeigte, dass der Hauptanteil positiv für den Ko-Stimulator CD28 ist. Durch die endotheliale Stimulierung steigt der Anteil an CD28- deutlich an, im Besonderen der Anteil an CD28-/CD45RO+ Zellen. CD28 ist bekanntermaßen für die

Aktivierung von T-Zellen notwendig und CD45RO ist ein Marker für aktivierte T-Zellen. Somit konnte die Aktivierung dieser spezifischen Subpopulation CD8⁺/CD28⁻ CTL nicht über CD28 erfolgen. In diesem speziellen Fall führten die Endothelzellen ihre Funktion als Antigen-präsentierende Zellen nicht über den B7/CD28 Signalweg aus ^[98,99]. Andere Studien zeigen, dass es einen CD28 unabhängigen Signalweg gibt, welcher die zytotoxischen T-Zellen in ihrer Aktivität beeinflusste ^[100,101]. Zur Charakterisierung dieser speziellen Subpopulation von CD8⁺ CTL und um deren Wirkmechanismus zu entschlüsseln, wurden weitere Marker zur Analyse hinzugezogen. Es wurden nicht nur funktionelle, sondern auch eindeutige phänotypische Unterschiede zwischen CD28⁺ und CD28⁻ T-Zellen festgestellt. Die CD28⁻ Subpopulation ist unter anderem größtenteils für CD27 negativ und für CD57 positiv. Hingegen ist die CD28⁺ Subpopulation der zytotoxischen T-Zellen für CD27 positiv und für CD57 negativ. Bei NK-Zellen konnte z.B. gezeigt werden, dass nach Aktivierung durch IL-2 CD57 exprimiert wird und dass diese Zellen einen reifen Phänotyp mit erhöhter Zytotoxizität darstellen ^[102]. Bisher wurde die CD57 Expression von CD8⁺ T-Zellen nur bei Patienten mit einem chronisch aktivierten Immunsystem gefunden. Es wurde fälschlicherweise angenommen, das CD8⁺/CD57⁺ CTL verstärkt IFN- γ exprimieren und nicht mehr in der Lage sind, nach Stimulierung zu proliferieren. Allerdings konnte in einer neueren Arbeit gezeigt werden das CD8⁺/CD57⁺ CTL durchaus durch andere Stimuli aktiviert werden können und somit kein Endstadium darstellen, sondern eine Art ausdifferenzierte Untereinheit von T-Zellen mit der Fähigkeit zu erhöhten Zellteilungen, erhöhter Zytotoxizität und erhöhter IFN- γ bzw. im besonderen IL-5 Produktion ^[103]. Wie vermutet, ergaben die ersten Zytotoxizitätstests mit CD8⁺/CD57⁺ bzw. CD8⁺/CD57⁻ CTL ähnliche Ergebnisse wie bei den Experimenten mit CD8⁺/CD28⁻ bzw. CD8⁺/CD28⁺ CTL. Die lytische Aktivität der CD57⁺ CTL war sehr viel höher als die der CD57⁻ und die Zugabe der Treg-Zellen verstärkte die Wirkung der CD57⁺ CTL, hatte aber keinen Einfluss auf die lytische Funktion der CD57⁻ CTL. Die Aktivierung von T-Zellen läuft allgemein in mehreren Stufen ab. Es ist zu vermuten, dass auch in diesem Fall verschiedene Signalkaskaden in Gang gesetzt werden. Aufgrund des festgestellten Phänotyps kann die beschriebene zytotoxische Wirkung von CD28⁻/CD57⁺ CTL nicht über den CD27/CD70 Signalweg erfolgen. Es ist aber nicht auszuschließen, dass die Signalkaskade über die Rezeptoren CD40/CD40L oder 4-1BB/4-1BBL (CD137L) abläuft ^[100,104,105]. Die Aktivierung der CD4⁺ T-Helfer-Zellen erfolgt durch die direkte oder indirekte Erkennung von Alloantigenen, die entweder direkt durch Spender-APC über den Spender-MHC-Klasse-II Komplex oder indirekt durch Empfänger-APC präsentiert werden. CD8⁺ zytotoxische T-Zellen werden durch die Präsentation von Alloantigenen über den MHC-Klasse-I Komplex aktiviert. Durch den Einsatz von W6/32, einem neutralisierenden anti-MHC-Klasse-I Antikörper, wurde in Zytotoxizitätstests die lytische Aktivität der CTL und auch deren Verstärkung durch Treg-Zellen komplett blockiert ^[25], was auf eine MHC-Klasse-

I-Restriktion beider Effekte hindeutet. Eine weitere phänotypische Charakterisierung von CD8+/CD28- CTL im Vergleich zu den CD8+/CD28+ CTL ist notwendig um einen möglichen Hinweis über den Wirkmechanismus zu bekommen. Wie bei den CD4+ T-Zellen gibt es auch CD8+/FoxP3+ T-Zellen. FoxP3 spielt eine wesentliche Rolle bei der Wirkungsweise von CD4+ T-Lymphozyten und könnte ebenso ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal zwischen CD28+ und CD28- zytotoxischen T-Zellen darstellen. Es gibt weitere Oberflächenmarker, welche hinsichtlich des Expressionsprofils von CD28- und CD28+ CTL untersucht werden sollten und dadurch weitere Aufschlüsse zum Wirkmechanismus geben könnten. Neben CD4+ gibt es z.B. auch CD8+ Treg-Zellen, mit dem Phänotyp CD8+CD103+ T-Zellen, welche eine verringerte zytotoxische Aktivität aufweisen ^[106]. CD38 gilt als Aktivierungsmarker für sowohl CD4+ als auch CD8+ T-Zellen. Neben dem CD28-CD80- gibt es auch den co-stimulatorischen CD40-CD154-Weg, der für eine Aktivierung von T-Zellen benötigt wird. Jeder dieser Marker spiegelt einen bestimmten Aktivierungsstatus bzw. funktionelle Richtung wieder und sollte unbedingt hinsichtlich der beiden Subpopulationen untersucht werden. Die Proliferationskapazität und die Zytotoxizität bei Virus-spezifischen CD8+ T-Zellen werden durch negative CD127 (IL-7R α) und positive Perforin Expression bestimmt ^[107]. Die Degranulations-Aktivität wird über die CD107a Expression bestimmt. Perforin ist ein zytolytisches Protein, welches bei der Degranulation von CTL freigesetzt wird und die Zellmembran der Zielzellen durchlöchert. Durch diese Poren können Granzyme in die Zielzelle eindringen und diese durch Apoptose zerstören. Es ist bekannt, dass die CD57 Expression in Zusammenhang mit der gleichzeitigen Exprimierung von Granzymen und Perforin steht ^[41]. CD57 könnte somit der entscheidende Marker sein um zwischen immunsupprimierenden und zytotoxischen CD8+/CD28- T-Zellen zu unterscheiden. Die beschriebenen CD8+ Suppressorzellen ^[39] besitzen demnach den Phänotyp CD8+/CD28-/CD57-. Die höhere Zytotoxizität der CD57+ CTL könnte auf die stärkere Expression der zytolytischen Moleküle zurückzuführen sein. Die funktionell stärkere Aktivität der CD57+ CTL könnte auch durch die Expression von NKRs (*natural killer cell receptors*) reguliert werden, welche hauptsächlich auf CD28-/CD57+ CTL nachzuweisen sind ^[108,109]. Welche Faktoren genau bei der Endothel-spezifischen Lyse von CD8+/CD28-/CD57+ CTL eine entscheidende Rolle spielen ist noch nicht bekannt. Intrazelluläre Analysen sowohl auf Protein-Ebene mittels Western-Blot Analysen, wie auch auf RNA-Ebene mittels PCR und Gelelektrophorese Analysen könnten Aufschluss zu den Signaltransduktionswegen geben. Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen) z.B. übertragen eingehende Signale durch Phosphorylierung weiterer MAP-Kinasen bzw. Transkriptionsfaktoren weiter, wodurch eine zelluläre Reaktion ausgelöst wird. Es könnte eine Regulierung der suppressiven Eigenschaft von CD45RA-Treg Zellen, durch die Aktivierung des Signaltransduktionsweges über NF- κ B, nachgewiesen werden. Zusätzliche genaue Charakterisierung des Zytokin-/Chemokin-Musters, wie z.B.

IFN- γ , TGF- β , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10, mittels ELISA Analysen sollten den Einblick in den inhibierenden bzw. aktivierenden Wirkmechanismus von Treg-Zellen geben können. Es gibt Befunde, in denen die Ko-Stimulation von OX40L (Mitglied der TNF Rezeptorfamilie) auf konventionellen T-Zellen, die Immunsuppression von Treg-Zellen über OX40 beeinflusst. Zur Aufklärung des Wirkmechanismus der verstärkten zytotoxischen Aktivität von CD8+/CD28-/CD57+ CTL durch die Zugabe regulatorischer T-Zellen müssen die entsprechenden phänotypischen Charakterisierungen, die spezifische Expressionen der beschriebenen Oberflächenmarker zwischen den verschiedenen Subpopulationen und entsprechende funktionelle Tests, wie z.B. die Blockierung spezifischer Antigene, durchgeführt werden.

Neben dem Einsatz von UCMSC als Zelltherapeutikum wäre es möglich, endothelial differenzierte UCMSC (eUCMSC) für ein *in vitro Monitoring* zu verwenden, basierend auf dem Einsatz von Patienten-spezifischen Endothelzellen zur Bestimmung Endothel-spezifischer Alloreaktionen nach Transplantationen. Mit dem Nachweis des von Willebrand Faktor ^[110] und der Ausbildung von Tuben im Matrigel wurde die Differenzierung in Endothel-ähnliche Zellen bestätigt. Die eUCMSC kamen in ihrer Ausprägung der HUVEC-Positivkontrolle durchaus nahe. Neben den Untersuchungen der eUCMSC in unserem Labor wurden die Zellen auch in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Walles am Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB (Stuttgart) mittels der Raman-Spektroskopie untersucht. Die Raman-Spektroskopie ist eine schwingungsspektroskopische Methode, die über die LASER-Technologie intrazelluläre Einschlüsse wie Organellen und Zytoskelettkomponenten auf Zelltyp-spezifische Weise detektiert. Alle Zellen wurden mit dem Raman-Spektrometer untersucht. Pro Zelltyp wurden 25-30 Zellen mit einer Integrationszeit von 100 Sekunden vermessen. Um die geringen Unterschiede innerhalb der spektralen Datensätze detektieren zu können, wurden die Spektren mit Hilfe einer multivariaten Analyse-methode ausgewertet. Diese Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis, PCA) bildet die spektralen Datensätze in einem neuen Koordinatensystem ab, wodurch jedes Spektrum durch einen Score repräsentiert wird (Quelle: AG Prof. Dr. Walles, Julius-Maximilians-Universität Würzburg). Wie in der Abbildung 38 zu sehen ist, lassen sich endothelial differenzierte Zellen deutlich von undifferenzierten UCMSC unterscheiden. Die resultierenden Profile der eUCMSC auf Einzelzellebene ähnelten mehr echten Endothelzellen als den undifferenzierten Vorläufer-MSC. Somit wurden die vorherigen Untersuchungen bestätigt, dass sich UCMSC endothelial differenzieren lassen. Die Raman-Spektroskopie erlaubt als erste und einzige Methode die nicht-invasive Qualitätskontrolle von potentiellen Zelltherapeutika und könnte nach entsprechender Validierung unter GMP-Bedingungen eingesetzt werden ^[111].

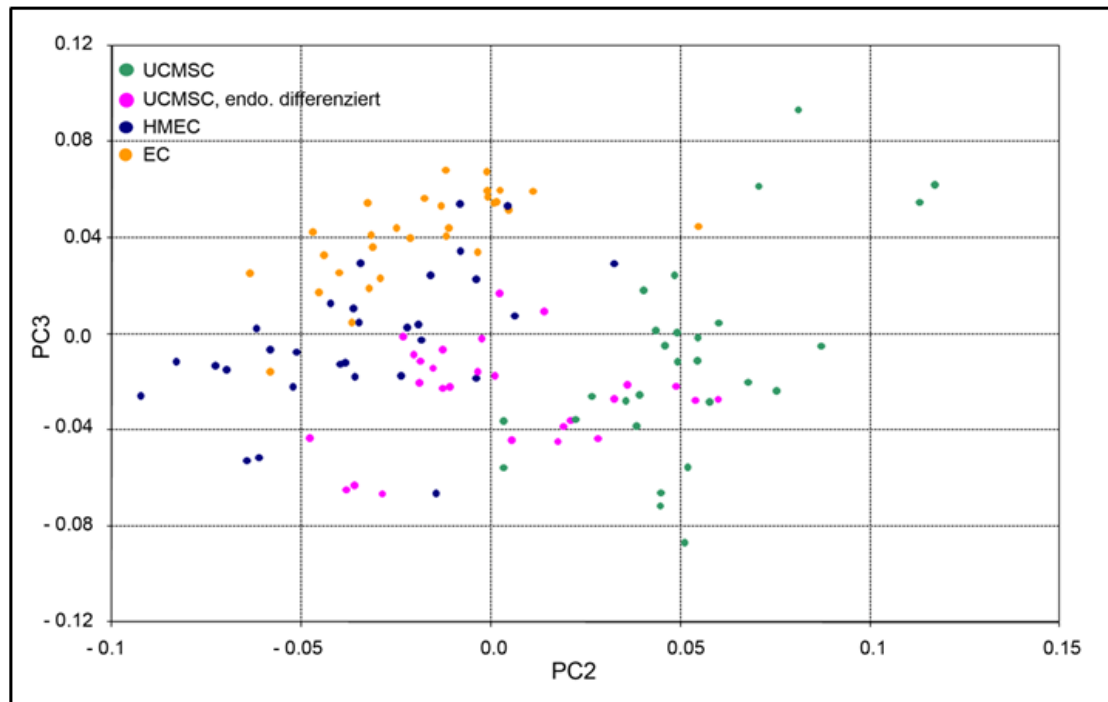


Abbildung 38: Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse der Raman Spektren von UCMSC, endothelial differenzierten UCMSC, HMEC und primären Endothelzellen (EC). Es ist zu erkennen, dass sich die undifferenzierten UCMSC sowie die primären EC und die HMEC über die PC2 (Principal Component 2) -Achse voneinander trennen lassen. Die Scores der endothelial differenzierten Zellen liegen zwischen den Scores der undifferenzierten UCMSC sowie denen der primären EC und den Zellen der HMEC-Zelllinie. (Quelle: AG Prof. Dr. Walles, Julius-Maximilians-Universität Würzburg)

Im *Tissue Engineering* könnten eUCMSC zur Behandlung vom geschädigten Endothel direkt vor dem Einsatz mittels dieser Methode überprüft werden. Grundvoraussetzung für ein *post-transplant in vitro Monitoring* Endothel-spezifischer Alloreaktionen mit Patienten-spezifischen eUCMSC ist deren Fähigkeit, allogene Immunreaktionen auszulösen. Erste Experimente mit eUCMSC als Zielzellen in Zytotoxizitätstest (siehe Abbildung 37) zeigten, dass diese Zellen im Gegensatz zu den undifferenzierten Vorläufern tatsächlich Allogenität besaßen und bei CD8⁺ CTL zytotoxische Reaktionen auslösten, die in ihrer Stärke denen gegenüber Endothelzellen vergleichbar war. Um eine stabile permanente Quelle an Patienten-spezifischen Endothelzellen zur Verfügung zu haben, wäre es möglich Endothelial-differenzierte UCMSC zu immortalisieren. Eine bereits etablierte Methode zur Herstellung solcher Endothelzelllinien ist die Immortalisierung durch die Ko-Transfektion mit hTERT (*human telomerase reverse transcriptase*) und dem SV40 (*simian virus 40*) large T Antigen^[112]. Vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer Transplantation könnten so PBMC eines Patienten entnommen werden und auf das Vorkommen von Endothel-spezifischen CTL und deren Endothel-spezifischen Reaktionen untersucht werden. Dies würde eine individualisierte Risiko-adaptierte Prophylaxe ermöglichen.

Zusätzlich zu einer zellulären Toleranzinduktion kann die Antigenität des Endothels auch pharmakologisch beeinflusst werden^[43,113]. Defibrotide (DF) ist ein polydisperses Gemisch

aus >90 % einzelsträngigen Polydesoxyribonukleotiden, welches anti-thrombotisch, anti-ischemisch und pro-fibrinolytisch wirkt ^[42]. Klinisch ist DF die einzige effektive Behandlungsmethode bei der schweren Lebervenenverschlusskrankheit (VOD) mit Multiorganversagen nach allogener SCT ^[114,115,116]. In vitro konnte gezeigt werden, dass DF die Apoptose induzierende und proinflammatorische Wirkung von Fludarabin (F-Ara; 2-fluoroadenine 9-β-D-arabinofuranoside) am Endothel unterbinden kann. F-Ara ist ein nicht-myeloablatives Immunsuppressivum zur Konditionierung vor SCT, das auch zur Chemotherapie bestimmter Leukämien eingesetzt wird. Von besonderer Relevanz ist die Beobachtung, dass DF auch die F-Ara-induzierte Antigenität des Endothels gegenüber allogenen CD8+ CTL antagonisieren kann ^[117]. Eine schützende Wirkung von DF auf eUCMSC wie auf HMEC, konnte bereits in ersten Experimenten gezeigt werden (siehe Abbildung 38 und 39).

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse sprechen nicht zwangsläufig gegen den klinischen Einsatz von Treg-Zellen als Immuntherapeutikum, allerdings sollte man dabei auch auf einen speziellen Schutz des Endothels achten. Neben dem Einsatz von Treg-Zellen in der Zelltherapie könnte man zusätzlich DF bzw. UCMSC oder eine Kombination aus beiden als Endothel-Schutz adjuvant verabreichen. Erste Versuche haben gezeigt, dass die Ko-Inkubation von HMEC mit UCMSC in der efferenten Phase in einer deutlichen Reduktion der Lyse der Endothelzellen durch CD8+/CD57+ CTL resultiert (siehe Abbildung 34). Präliminäre Daten unseres Labors mit BMMSC dokumentieren denselben Effekt und deuten darauf hin, dass die gleichzeitige Gabe von DF diesen Effekt noch zusätzlich verstärken (Daten nicht gezeigt). Die Kombination von UCMSC und DF als Immuntherapie könnte sogar eine vielversprechende Alternative zu den Treg-Zellen darstellen. Ein effektiver Endothelschutz, ein Patienten-spezifisches *post-transplant in vitro Monitoring* mit entsprechender optimierter Risiko-adaptierten Prophylaxe, können helfen Nebenwirkungen und Folgekomplikationen zu verhindern. Dadurch könnte das Langzeitüberleben des Transplantats und folglich die Lebensqualität der Patienten deutlich verbessert werden. Neben der Überlebensrate und der Lebensqualität gibt es bei Transplantationen auch gesundheitsökonomische Aspekte zu beachten. Durch eine Patienten-spezifische Therapie könnte nicht nur die Lebensqualität der Patienten durch eine verkürzte Therapiezeit gesteigert werden, sondern auch letztendlich entsprechende Folgekosten deutlich reduziert werden.

8 Literaturverzeichnis

1. Aird, W. C. Endothelial cell heterogeneity. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012. 2:a006429-
2. Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G., and Minick, C. R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* 1973. 52:2745-2756.
3. Venkatraman, S. S., Tan, L. P., Joso, J. F., Boey, Y. C., and Wang, X. Biodegradable stents with elastic memory. *Biomaterials.* 2006. 27(8):1573-1578.
4. Aird, W. C. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood.* 2003. 101:3765-3777.
5. Ferrara, J. L., Levine, J. E., Reddy, P., and Holler, E. Graft-versus-host disease. *Lancet.* 2009. 373:1550-1561.
6. Tilney, N. L. and Kupiec-Weglinski, J. W. The biology of acute transplant rejection. *Ann. Surg.* 1991. 214(2):98-106.
7. Azuma, H. and Tilney, N. L. Chronic graft rejection. *Curr. Opin. Immunol.* 1994. 6:770-776.
8. Paris, F., Fuks, Z., Kang, A., Capodieci, P., Juan, G., Ehleiter, D., Haimovitz-Friedman, A., Cordon-Cardo, C., and Kolesnick, R. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science.* 2001. 293:293-297.
9. Riley, J. L., June, C. H., and Blazar, B. R. Human T regulatory cell therapy: take a billion or so and call me in the morning. *Immunity.* 2009. 30:656-665.
10. Hoffmann, P., Ermann, J., Edinger, M., Fathman, C. G., and Strober, S. Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J. Exp. Med.* 2002. 196:389-399.
11. Edinger, M., Hoffmann, P., Ermann, J., Drago, K., Fathman, C. G., Strober, S., and Negrin, R. S. CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat. Med.* 2003. 9:1144-1150.
12. LeBlanc, K., Frassoni, F., Ball, L., Locatelli, F., Roelofs, H., Lewis, I., Lanino, E., Sundberg, B., Bernardo, M. E., Remberger, M., Dini, G., Egeler, R. M., Bacigalupo, A., Fibbe, W., and Ringden, O. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet.* 2008. 371:1579-1586.
13. Wagers, A. J. and Weissman, I. L. Plasticity of adult stem cells. *Cell.* 2004. 116(5):639-648.
14. Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., and Marshak, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999. 284:143-147.

15. Wu, K. H., Zhou, B., Lu, S. H., Feng, B., Yang, S. G., Du, W. T., Gu, D. S., Han, Z. C., and Liu, Y. L. In vitro and in vivo differentiation of human umbilical cord derived stem cells into endothelial cells. *J. Cell Biochem.* 2007. 100:608-616.
16. Wang, H. S., Hung, S. C., Peng, S. T., Huang, C. C., Wei, H. M., Guo, Y. J., Fu, Y. S., Lai, M. C., and Chen, C. C. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells.* 2004. 22:1330-1337.
17. Weiss, M. L., Medicetty, S., Bledsoe, A. R., Rachakatla, R. S., Choi, M., Merchav, S., Luo, Y., Rao, M. S., Velagaleti, G., and Troyer, D. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. *Stem Cells.* 2006. 24:781-792.
18. Horwitz, E. M., Le, B. K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Deans, R. J., Krause, D. S., and Keating, A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2005. 7:393-395.
19. Seshareddy, K., Troyer, D., and Weiss, M. L. Method to Isolate Mesenchymal-Like Cells from Wharton's Jelly of Umbilical Cord. *Methods Cell Biol.* 2008. 86:101-119.
20. Troyer, D. L. and Weiss, M. L. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells.* 2008. 26:591-599.
21. Baksh, D., Yao, R., and Tuan, R. S. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells.* 2007. 25:1384-1392.
22. Pittenger, M. F. and Martin, B. J. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ. Res.* 2004. 95:9-20.
23. Hass, R. and Otte, A. Mesenchymal stem cells as all-round supporters in a normal and neoplastic microenvironment. *Cell Commun. Signal.* 2012. 10(1):26-
24. Yoo, K. H., Jang, I. K., Lee, M. W., Kim, H. E., Yang, M. S., Eom, Y., Lee, J. E., Kim, Y. J., Yang, S. K., Jung, H. L., Sung, K. W., Kim, C. W., and Koo, H. H. Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. *Cell Immunol.* 2009. 259:150-156.
25. Weiss, M. L., Anderson, C., Medicetty, S., Seshareddy, K. B., Weiss, R. J., VanderWerff, I., Troyer, D., and McIntosh, K. R. Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. *Stem Cells.* 2008. 26:2865-2874.
26. Shevach, E. M. Mechanisms of foxp3⁺ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity.* 2009. 30:636-645.
27. Wilczynski, J. R., Radwan, M., and Kalinka, J. The characterization and role of regulatory T cells in immune reactions. *Front Biosci.* 2008. 13:2266-2274.
28. Sakaguchi, S., Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., and Yamaguchi, T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int. Immunol.* 2009. 21:1105-1111.
29. Buckner, J. H. Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 2010. 10:849-859.

30. Mills, K. H. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat. Rev. Immunol.* 2004. 4:841-855.
31. Riley, J. L., June, C. H., and Blazar, B. R. Human T regulatory cell therapy: take a billion or so and call me in the morning. *Immunity.* 2009. 30:656-665.
32. Ades, E. W., Candal, F. J., Swerlick, R. A., George, V. G., Summers, S., Bosse, D. C., and Lawley, T. J. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J. Invest Dermatol.* 1992. 99:683-690.
33. Angulo, R. and Fulcher, D. A. Measurement of Candida-specific blastogenesis: comparison of carboxyfluorescein succinimidyl ester labelling of T cells, thymidine incorporation, and CD69 expression. *Cytometry.* 1998. 34:143-151.
34. Parish, C. R. Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol. Cell Biol.* 1999. 77:499-508.
35. Agarwal, C., Singh, R. P., Dhanalakshmi, S., Tyagi, A. K., Tecklenburg, M., Sclafani, R. A., and Agarwal, R. Silibinin upregulates the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors and causes cell cycle arrest and apoptosis in human colon carcinoma HT-29 cells. *Oncogene.* 2003. 22:8271-8282.
36. Meisel, R., Brockers, S., Heseler, K., Degistirici, O., Bulle, H., Woite, C., Stuhlsatz, S., Schwippert, W., Jager, M., Sorg, R., Henschler, R., Seissler, J., Dilloo, D., and Daubener, W. Human but not murine multipotent mesenchymal stromal cells exhibit broad-spectrum antimicrobial effector function mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Leukemia.* 2011. 25:648-654.
37. Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C. M., and Hafler, D. A. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2010. 10:490-500.
38. Eissner, G., Hartmann, I., Kesikli, A., Holler, E., Haffner, S., Sax, T., Schray, C., Meiser, B., and Reichart, B. CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells enhance the allogeneic activity of endothelial-specific CD8+CD28-CTL. *Int. Immunol.* 2011. 23:485-492.
39. Fenoglio, D., Ferrera, F., Fravega, M., Balestra, P., Battaglia, F., Proietti, M., Andrei, C., Olive, D., Antonio, L. C., Indiveri, F., and Filaci, G. Advancements on phenotypic and functional characterization of non-antigen-specific CD8+CD28- regulatory T cells. *Hum. Immunol.* 2008. 69:745-750.
40. Wang, X. N., Haniffa, M. A., Holtick, U., Collin, M. P., Jackson, G., Hilkens, C. M., Holler, E., Edinger, M., Hoffmann, P., and Dickinson, A. M. Regulatory T-cell suppression of CD8+ T-cell-mediated graft-versus-host reaction requires their presence during priming. *Transplantation.* 2009. 88:188-197.
41. Chattopadhyay, P. K., Betts, M. R., Price, D. A., Gostick, E., Horton, H., Roederer, M., and De Rosa, S. C. The cytolytic enzymes granzyme A, granzyme B, and perforin: expression patterns, cell distribution, and their relationship to cell maturity and bright CD57 expression. *J. Leukoc. Biol.* 2009. 85:88-97.
42. Morabito, F., Gentile, M., Gay, F., Bringham, S., Mazzone, C., Vigna, E., Musto, P., Di, R. F., and Palumbo, A. Insights into defibrotide: an updated review. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2009. 9:763-772.
43. Eissner, G., Multhoff, G., Gerbitz, A., Kirchner, S., Bauer, S., Haffner, S., Sondermann, D., Andreesen, R., and Holler, E. Fludarabine induces

- apoptosis, activation, and allogenicity in human endothelial and epithelial cells: protective effect of defibrotide. *Blood*. 2002. 100:334-340.
44. Koc, O. N., Gerson, S. L., Cooper, B. W., Dyhouse, S. M., Haynesworth, S. E., Caplan, A. I., and Lazarus, H. M. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 2000. 18:307-316.
 45. Devine, S. M. and Hoffman, R. Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr. Opin. Hematol.* 2000. 7:358-363.
 46. Prasanna, S. J., Gopalakrishnan, D., Shankar, S. R., and Vasandan, A. B. Pro-inflammatory cytokines, IFN γ and TNF α , influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. *PLoS. One.* 2010. 5:e9016-
 47. Bruder, S. P., Jaiswal, N., Ricalton, N. S., Mosca, J. D., Kraus, K. H., and Kadiyala, S. Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin. Orthop. Relat Res.* 1998. S247-S256.
 48. Strauer, B. E., Brehm, M., Zeus, T., Kostering, M., Hernandez, A., Sorg, R. V., Kogler, G., and Wernet, P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation.* 2002. 106:1913-1918.
 49. Haynesworth, S. E., Goshima, J., Goldberg, V. M., and Caplan, A. I. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone.* 1992. 13:81-88.
 50. Prockop, D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 1997. 276:71-74.
 51. Hass, R., Kasper, C., Bohm, S., and Jacobs, R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun. Signal.* 2011. 9:12-19.
 52. Yang, Z. X., Han, Z. B., Ji, Y. R., Wang, Y. W., Liang, L., Chi, Y., Yang, S. G., Li, L. N., Luo, W. F., Li, J. P., Chen, D. D., Du, W. J., Cao, X. C., Zhuo, G. S., Wang, T., and Han, Z. C. CD106 identifies a subpopulation of mesenchymal stem cells with unique immunomodulatory properties. *PLoS. One.* 2013. 8(3):e59354-
 53. Sensebe, L. and Bourin, P. Mesenchymal stem cells for therapeutic purposes. *Transplantation.* 2009. 87:S49-S53.
 54. Haack-Sorensen, M., Friis, T., Bindslev, L., Mortensen, S., Johnsen, H. E., and Kastrup, J. Comparison of different culture conditions for human mesenchymal stromal cells for clinical stem cell therapy. *Scand. J. Clin. Lab Invest.* 2008. 68:192-203.
 55. Kestendjieva, S., Kyurkchiev, D., Tsvetkova, G., Mehandjiev, T., Dimitrov, A., Nikolov, A., and Kyurkchiev, S. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the human umbilical cord. *Cell Biol. Int.* 2008. 32:724-732.
 56. Romanov, Y. A., Svintsitskaya, V. A., and Smirnov, V. N. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells.* 2003. 21:105-110.

57. Covas, D. T., Siufi, J. L., Silva, A. R., and Orellana, M. D. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2003. 36:1179-1183.
58. Kunter, U., Rong, S., Boor, P., Eitner, F., Muller-Newen, G., Djuric, Z., van Roeyen, C. R., Konieczny, A., Ostendorf, T., Villa, L., Milovanceva-Popovska, M., Kerjaschki, D., and Floege, J. Mesenchymal stem cells prevent progressive experimental renal failure but maldifferentiate into glomerular adipocytes. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2007. 18:1754-1764.
59. Breitbach, M., Bostani, T., Roell, W., Xia, Y., Dewald, O., Nygren, J. M., Fries, J. W., Tiemann, K., Bohlen, H., Hescheler, J., Welz, A., Bloch, W., Jacobsen, S. E., and Fleischmann, B. K. Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood.* 2007. 110:1362-1369.
60. Rachakatla, R. S., Marini, F., Weiss, M. L., Tamura, M., and Troyer, D. Development of human umbilical cord matrix stem cell-based gene therapy for experimental lung tumors. *Cancer Gene Ther.* 2007. 14:828-835.
61. Chen, M. Y., Lie, P. C., Li, Z. L., and Wei, X. Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp. Hematol.* 2009. 37:629-640.
62. Bieback, K., Kern, S., Kluter, H., and Eichler, H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells.* 2004. 22:625-634.
63. Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Kluter, H., and Bieback, K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells.* 2006. 24:1294-1301.
64. Eichler, H., Meckies, J., Schmut, N., Kern, S., Kluter, H., and Zieger, W. [Aspects of donation and processing of stem cell transplants from umbilical cord blood]. *Z. Geburtshilfe Neonatol.* 2001. 205:218-223.
65. Bieback, K., Hecker, A., Kocaomer, A., Lannert, H., Schallmoser, K., Strunk, D., and Kluter, H. Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells.* 2009. 27(9):2331-2341.
66. Schallmoser, K., Rohde, E., Bartmann, C., Obenauf, A. C., Reinisch, A., and Strunk, D. Platelet-derived growth factors for GMP-compliant propagation of mesenchymal stromal cells. *Biomed. Mater. Eng.* 2009. 19:271-276.
67. Minguell, J. J., Erices, A., and Conget, P. Mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med.* (Maywood.). 2001. 226:507-520.
68. Wagner, W., Wein, F., Seckinger, A., Frankhauser, M., Wirkner, U., Krause, U., Blake, J., Schwager, C., Eckstein, V., Ansorge, W., and Ho, A. D. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp. Hematol.* 2005. 33:1402-1416.
69. Conget, P. A. and Minguell, J. J. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J. Cell Physiol.* 1999. 181:67-73.

70. Nauta, A. J. and Fibbe, W. E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*. 2007. 110:3499-3506.
71. Aggarwal, S. and Pittenger, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005. 105:1815-1822.
72. Ryan, J. M., Barry, F. P., Murphy, J. M., and Mahon, B. P. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J. Inflamm. (Lond)*. 2005. 2:8-
73. Groh, M. E., Maitra, B., Szekely, E., and Koc, O. N. Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells. *Exp. Hematol*. 2005. 33:928-934.
74. Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A. I., Zhao, R. C., and Shi, Y. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*. 2008. 2:141-150.
75. Li, W., Ren, G., Huang, Y., Su, J., Han, Y., Li, J., Chen, X., Cao, K., Chen, Q., Shou, P., Zhang, L., Yuan, Z. R., Roberts, A. I., Shi, S., Le, A. D., and Shi, Y. Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses. *Cell Death. Differ*. 2012. 19(9):1505-1513.
76. Renner, P., Eggenhofer, E., Rosenauer, A., Popp, F. C., Steinmann, J. F., Slowik, P., Geissler, E. K., Piso, P., Schlitt, H. J., and Dahlke, M. H. Mesenchymal stem cells require a sufficient, ongoing immune response to exert their immunosuppressive function. *Transplant. Proc*. 2009. 41(6):2607-2611.
77. Ren, G., Su, J., Zhang, L., Zhao, X., Ling, W., L'huillie, A., Zhang, J., Lu, Y., Roberts, A. I., Ji, W., Zhang, H., Rabson, A. B., and Shi, Y. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells*. 2009. 27(8):1954-1962.
78. Hoffman, R. A., Mahidhara, R. S., Wolf-Johnston, A. S., Lu, L., Thomson, A. W., and Simmons, R. L. Differential modulation of CD4 and CD8 T-cell proliferation by induction of nitric oxide synthesis in antigen presenting cells. *Transplantation*. 2002. 74:836-845.
79. Niedbala, W., Cai, B., and Liew, F. Y. Role of nitric oxide in the regulation of T cell functions. *Ann. Rheum. Dis*. 2006. 65 Suppl 3:iii37-iii40.
80. Sato, K., Ozaki, K., Oh, I., Meguro, A., Hatanaka, K., Nagai, T., Muroi, K., and Ozawa, K. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood*. 2007. 109:228-234.
81. Grohmann, U., Fallarino, F., and Puccetti, P. Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends Immunol*. 2003. 24:242-248.
82. Uyttenhove, C., Pilotte, L., Theate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T., and Van den Eynde, B. J. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat. Med*. 2003. 9:1269-1274.
83. Mellor, A. L. and Munn, D. H. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat. Rev. Immunol*. 2004. 4:762-774.

84. Qian, F., Liao, J., Vilella, J., Edwards, R., Kalinski, P., Lele, S., Shrikant, P., and Odunsi, K. Effects of 1-methyltryptophan stereoisomers on IDO2 enzyme activity and IDO2-mediated arrest of human T cell proliferation. *Cancer Immunol. Immunother.* 2012. 61:2013-2020.
85. Needleman, P., Turk, J., Jakschik, B. A., Morrison, A. R., and Lefkowitz, J. B. Arachidonic acid metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* 1986. 55:69-102.
86. von Bergwelt-Baildon, M. S., Popov, A., Saric, T., Chemnitz, J., Classen, S., Stoffel, M. S., Fiore, F., Roth, U., Beyer, M., Debey, S., Wickenhauser, C., Hanisch, F. G., and Schultze, J. L. CD25 and indoleamine 2,3-dioxygenase are up-regulated by prostaglandin E2 and expressed by tumor-associated dendritic cells in vivo: additional mechanisms of T-cell inhibition. *Blood.* 2006. 108:228-237.
87. Kang, J. W., Koo, H. C., Hwang, S. Y., Kang, S. K., Ra, J. C., Lee, M. H., and Park, Y. H. Immunomodulatory effects of human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells. *J. Vet. Sci.* 2012. 13(1):23-31.
88. Paris, F., Fuks, Z., Kang, A., Capodice, P., Juan, G., Ehleiter, D., Haimovitz-Friedman, A., Cordon-Cardo, C., and Kolesnick, R. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science.* 2001. 293:293-297.
89. Ferrara, J. L., Levine, J. E., Reddy, P., and Holler, E. Graft-versus-host disease. *Lancet.* 2009. 373:1550-1561.
90. Eissner, G., Kohlhuber, F., Grell, M., Ueffing, M., Scheurich, P., Hieke, A., Multhoff, G., Bornkamm, G. W., and Holler, E. Critical involvement of transmembrane tumor necrosis factor- α in endothelial programmed cell death mediated by ionizing radiation and bacterial endotoxin. *Blood.* 1995. 86:4184-4193.
91. Eissner, G., Lindner, H., Behrends, U., Kolch, W., Hieke, A., Klauke, I., Bornkamm, G. W., and Holler, E. Influence of bacterial endotoxin on radiation-induced activation of human endothelial cells in vitro and in vivo: protective role of IL-10. *Transplantation.* 1996. 62:819-827.
92. Lindner, H., Holler, E., Ertl, B., Multhoff, G., Schreglmann, M., Klauke, I., Schultz-Hector, S., and Eissner, G. Peripheral blood mononuclear cells induce programmed cell death in human endothelial cells and may prevent repair: role of cytokines. *Blood.* 1997. 89:1931-1938.
93. Lindner, H., Holler, E., Gerbitz, A., Johnson, J. P., Bornkamm, G. W., and Eissner, G. Influence of bacterial endotoxin on radiation-induced activation of human endothelial cells in vitro and in vivo: interleukin-10 protects against transendothelial migration. *Transplantation.* 1997. 64:1370-1373.
94. Eissner, G., Multhoff, G., and Holler, E. Influence of bacterial endotoxin on the allogenicity of human endothelial cells. *Bone Marrow Transplant.* 1998. 21:1286-1288.
95. Kreisel, D., Krupnick, A. S., Gelman, A. E., Engels, F. H., Popma, S. H., Krasinskas, A. M., Balsara, K. R., Szeto, W. Y., Turka, L. A., and Rosengard, B. R. Non-hematopoietic allograft cells directly activate CD8⁺ T cells and trigger acute rejection: an alternative mechanism of allorecognition. *Nat. Med.* 2002. 8:233-239.

96. Liu, T., Soong, L., Liu, G., Konig, R., and Chopra, A. K. CD44 expression positively correlates with Foxp3 expression and suppressive function of CD4⁺ Treg cells. *Biol. Direct.* 2009. 4:40-
97. Chen, X., Subleski, J. J., Hamano, R., Howard, O. M., Wilttrout, R. H., and Oppenheim, J. J. Co-expression of TNFR2 and CD25 identifies more of the functional CD4⁺FOXP3⁺ regulatory T cells in human peripheral blood. *Eur. J. Immunol.* 2010. 40:1099-1106.
98. Rose, M. L. Endothelial cells as antigen-presenting cells: role in human transplant rejection. *Cell Mol. Life Sci.* 1998. 54:965-978.
99. Dengler, T. J. and Pober, J. S. Human vascular endothelial cells stimulate memory but not naive CD8⁺ T cells to differentiate into CTL retaining an early activation phenotype. *J. Immunol.* 2000. 164:5146-5155.
100. Clarkson, M. R. and Sayegh, M. H. T-cell costimulatory pathways in allograft rejection and tolerance. *Transplantation.* 2005. 80:555-563.
101. Yamada, A., Kishimoto, K., Dong, V. M., Sho, M., Salama, A. D., Anosova, N. G., Benichou, G., Mandelbrot, D. A., Sharpe, A. H., Turka, L. A., Auchincloss, H., Jr., and Sayegh, M. H. CD28-independent costimulation of T cells in alloimmune responses. *J. Immunol.* 2001. 167:140-146.
102. Lopez-Verges, S., Milush, J. M., Pandey, S., York, V. A., Iwakura-Hoyt, J., Pircher, H., Norris, P. J., Nixon, D. F., and Lanier, L. L. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16⁺ NK-cell subset. *Blood.* 2010. 116:3865-3874.
103. Chong, L. K., Aicheler, R. J., Llewellyn-Lacey, S., Tomasec, P., Brennan, P., and Wang, E. C. Proliferation and interleukin 5 production by CD8hi CD57⁺ T cells. *Eur. J. Immunol.* 2008. 38:995-1000.
104. Cannons, J. L., Lau, P., Ghumman, B., DeBenedette, M. A., Yagita, H., Okumura, K., and Watts, T. H. 4-1BB ligand induces cell division, sustains survival, and enhances effector function of CD4 and CD8 T cells with similar efficacy. *J. Immunol.* 2001. 167:1313-1324.
105. Shuford, W. W., Klussman, K., Tritchler, D. D., Loo, D. T., Chalupny, J., Siadak, A. W., Brown, T. J., Emswiler, J., Raecho, H., Larsen, C. P., Pearson, T. C., Ledbetter, J. A., Aruffo, A., and Mittler, R. S. 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8⁺ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses. *J. Exp. Med.* 1997. 186:47-55.
106. Koch, S. D., Uss, E., van Lier, R. A., and ten, B., I. Alloantigen-induced regulatory CD8⁺CD103⁺ T cells. *Hum. Immunol.* 2008. 69:737-744.
107. Cellerai, C., Perreau, M., Rozot, V., Enders, F. B., Pantaleo, G., and Harari, A. Proliferation capacity and cytotoxic activity are mediated by functionally and phenotypically distinct virus-specific CD8 T cells defined by interleukin-7R α (CD127) and perforin expression. *J. Virol.* 2010. 84:3868-3878.
108. Abedin, S., Michel, J. J., Lemster, B., and Vallejo, A. N. Diversity of NKR expression in aging T cells and in T cells of the aged: the new frontier into the exploration of protective immunity in the elderly. *Exp. Gerontol.* 2005. 40(7):537-548.

109. Tarazona, R., DelaRosa, O., Alonso, C., Ostos, B., Espejo, J., Pena, J., and Solana, R. Increased expression of NK cell markers on T lymphocytes in aging and chronic activation of the immune system reflects the accumulation of effector/senescent T cells. *Mech. Ageing Dev.* 2000. 121(1-3):77-88.
110. Wagner, D. D., Olmsted, J. B., and Marder, V. J. Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *J. Cell Biol.* 1982. 95:355-360.
111. Votteler, M., Carvajal Berrio, D. A., Pudlas, M., Walles, H., and Schenke-Layland, K. Non-contact, label-free monitoring of cells and extracellular matrix using Raman spectroscopy. *J. Vis. Exp.* 2012. (63). pii:3977-
112. Krump-Konvalinkova, V., Bittinger, F., Unger, R. E., Peters, K., Lehr, H. A., and Kirkpatrick, C. J. Generation of human pulmonary microvascular endothelial cell lines. *Lab Invest.* 2001. 81:1717-1727.
113. Eissner, G., Iacobelli, M., Bluml, S., Burger, V., Haffner, S., Andreesen, R., and Holler, E. Oligotide, a defibrotide derivative, protects human microvascular endothelial cells against fludarabine-induced activation, damage and allogenicity. *Bone Marrow Transplant.* 2005. 35:915-920.
114. Richardson, P. G., Elias, A. D., Krishnan, A., Wheeler, C., Nath, R., Hoppensteadt, D., Kinchla, N. M., Neuberg, D., Waller, E. K., Antin, J. H., Soiffer, R., Vredenburgh, J., Lill, M., Woolfrey, A. E., Bearman, S. I., Iacobelli, M., Fareed, J., and Guinan, E. C. Treatment of severe veno-occlusive disease with defibrotide: compassionate use results in response without significant toxicity in a high-risk population. *Blood.* 1998. 92:737-744.
115. Richardson, P. G., Murakami, C., Jin, Z., Warren, D., Momtaz, P., Hoppensteadt, D., Elias, A. D., Antin, J. H., Soiffer, R., Spitzer, T., Avigan, D., Bearman, S. I., Martin, P. L., Kurtzberg, J., Vredenburgh, J., Chen, A. R., Arai, S., Vogelsang, G., McDonald, G. B., and Guinan, E. C. Multi-institutional use of defibrotide in 88 patients after stem cell transplantation with severe veno-occlusive disease and multisystem organ failure: response without significant toxicity in a high-risk population and factors predictive of outcome. *Blood.* 2002. 100:4337-4343.
116. Chopra, R., Eaton, J. D., Grassi, A., Potter, M., Shaw, B., Salat, C., Neumeister, P., Finazzi, G., Iacobelli, M., Bowyer, K., Prentice, H. G., and Barbui, T. Defibrotide for the treatment of hepatic veno-occlusive disease: results of the European compassionate-use study. *Br. J. Haematol.* 2000. 111:1122-1129.
117. Eissner, G., Multhoff, G., Gerbitz, A., Kirchner, S., Bauer, S., Haffner, S., Sondermann, D., Andreesen, R., and Holler, E. Fludarabine induces apoptosis, activation, and allogenicity in human endothelial and epithelial cells: protective effect of defibrotide. *Blood.* 2002. 100:334-340.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AK	<u>A</u> ntik <u>ö</u> rper
APC	<u>A</u> llophycocyanin
APC	Antigen-präsentierende Zelle
β-FGF	basischer Fibroblastenwachstumsfaktor
BLCL	<u>B</u> -lymphoblastoid <u>c</u> ell <u>l</u> ine
BMMSC	<u>B</u> one <u>M</u> arrow <u>D</u> erived <u>M</u> esenchymal <u>S</u> tem <u>C</u> ells
BSA	<u>B</u> ovines <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CCR-7	<u>C</u> hemokine (c-c motif) <u>r</u> eceptor type <u>7</u>
CD	<u>C</u> luster of <u>D</u> ifferentiation (Nomenklatur der Oberflächenantigene)
CFSE	<u>C</u> arboxyfluorescein <u>s</u> uccinimidyl <u>e</u> ster
CFU	<u>C</u> olony <u>F</u> orming <u>U</u> nit
CO ₂	Kohlendioxid
CsA	<u>C</u> yclosporin <u>A</u>
CTLA-4	<u>c</u> ytotoxic <u>t</u> -lymphocyte <u>a</u> ntigen <u>4</u>
DAMP	<u>D</u> amage- <u>a</u> ssociated <u>m</u> olecular <u>p</u> attern <u>m</u> olecules
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DF	<u>D</u> efibrotide
DIOC18 ₍₃₎	3,3'-dioctadecyloxacarbocanin Perchlorat
DMEM	<u>D</u> ulbeccos <u>m</u> odified <u>e</u> agle <u>m</u> edium
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid
DNS	<u>D</u> esoxyribonukleinsäure
EA.hy926	<i>fusion product of HUVEC and A549 lung carcinoma cells (macrovascular)</i>
EDTA	<u>E</u> thylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
ELISA	<u>e</u> nzyme <u>l</u> inked <u>i</u> mmunosorbent <u>a</u> ssay
eUCMSC	<u>E</u> ndothelial differenzierte <u>U</u> CMSC
FACS	<u>f</u> luorescence- <u>a</u> ctivated <u>c</u> ell <u>s</u> canner
F-Ara	<u>F</u> ludarabin (2-fluoroadenine 9-β-D-arabinofuranoside)
FITC	<u>F</u> luorescein <u>I</u> sothiocyanate
FCS	Fötales Rinderserum (<i>fetal calf serum</i>)

GITR	<i>glucocorticoid-induced <u>T</u>NFR-related protein</i>
GM#1	<i><u>G</u>rowth <u>M</u>edium #1</i>
GMP	<i><u>G</u>ood <u>M</u>anufacturing <u>P</u>ractice (gute Herstellungspraxis)</i>
GvHD	<i><u>G</u>raft-<u>v</u>ersus-<u>H</u>ost-<u>D</u>isease</i>
HLA	<i><u>H</u>umanes <u>L</u>eukozyten-assoziiertes <u>A</u>ntigen</i>
HMEC	<i><u>H</u>uman <u>M</u>icrovascular <u>E</u>ndothelial <u>C</u>ells</i>
HMVEC-L	<i><u>l</u>ung-derived <u>h</u>uman <u>m</u>icrovascular <u>e</u>ndothelial <u>c</u>ells</i>
HS	<i><u>H</u>uman<u>s</u>erum</i>
Hsp	<i><u>H</u>eat <u>S</u>hock <u>P</u>rotein</i>
HUVEC	<i><u>H</u>uman <u>U</u>mbilical <u>V</u>ein <u>E</u>ndothelial <u>C</u>ells</i>
ICAM-1	<i><u>i</u>nter<u>c</u>ellular <u>a</u>dhesion <u>m</u>olecule <u>1</u></i>
IDO	<i><u>I</u>ndolamine-2,3-<u>D</u>ioxygenase</i>
IFN	<i><u>I</u>nter<u>f</u>eron</i>
Ig	<i><u>I</u>mmunglobulin</i>
IL	<i><u>I</u>nterleukin</i>
LPS	<i><u>L</u>ipopolysaccharid</i>
MC	<i><u>M</u>esen<u>C</u>ult-XF (Stemcell Technologies)</i>
MCDB	<i><u>C</u>hick <u>F</u>ibroblast <u>B</u>asal <u>M</u>edium</i>
MHC	<i>Haupthistokompatibilitätskomplex (<u>m</u>ajor <u>h</u>istocompatibility <u>c</u>omplex)</i>
MLR	<i><u>m</u>ixed <u>l</u>ymphocyte <u>r</u>eaction</i>
1-MT	<i>1-<u>M</u>ethyltryptophan</i>
PBMC	<i><u>p</u>eripheral <u>b</u>lood <u>m</u>ononuclear <u>c</u>ells</i>
PBS	<i>Phosphat-gepufferte Salzlösung (<u>p</u>hosphate <u>b</u>uffered <u>s</u>aline)</i>
PDGF	<i>Thrombozyten Wachstumsfaktor (<u>p</u>latelet-<u>d</u>erived <u>g</u>rowth <u>f</u>actor)</i>
PE	<i><u>P</u>hycoerythin</i>
PGE ₂	<i><u>P</u>rostaglandin <u>E</u>₂</i>
PI	<i><u>P</u>ropidiumiodid</i>
PPEC	<i><u>p</u>rimary <u>h</u>uman <u>m</u>icrovascular <u>e</u>ndothelial <u>c</u>ells of foreskin (prepuce)</i>
PVSC	<i>Perivaskuläre Stammzellen (<u>P</u>erivascular <u>S</u>tem <u>C</u>ells)</i>
®	<i><u>R</u>egistered <u>T</u>rade <u>M</u>ark</i>
RPMI	<i>benannt nach dem „<u>R</u>oswell-<u>P</u>ark-<u>M</u>emorial-<u>I</u>nstitute“</i>
RT	<i><u>R</u>aum<u>t</u>emperatur</i>
SP	<i><u>S</u>tem<u>P</u>ro MSC SFM (Gibco)</i>
SZT	<i><u>S</u>tammzell<u>t</u>ransplantation</i>
T25 (75/150)	<i>Gewebekulturflasche 25 cm² (75/150 cm²)</i>
™	<i><u>U</u>nregistered <u>T</u>rade <u>M</u>ark</i>

TNF	<u>T</u> umorne <u>k</u> rosefakt <u>o</u> r
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (<i><u>t</u>ransforming <u>g</u>rowth <u>f</u>actor</i>)
TW	<u>T</u> rans <u>w</u> ell
Tx	Transplantation
UCMSC	<u>U</u> mbilical <u>C</u> ord Derived <u>M</u> esenchymal <u>S</u> tem <u>C</u> ells
VEGF	<u>v</u> ascular <u>e</u> ndothelial growth <u>f</u> actor
vWF	<u>v</u> on <u>W</u> illebrand <u>F</u> aktor
WJC	<u>W</u> harton´s <u>J</u> elly <u>C</u> ells

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildungs-Nr.	Seite	Titel
1	3	Darstellung des Aufbaus von Gefäßen
2	5	Endothelpathologie in der Transplantationsmedizin
3	7	Funktionen mesenchymaler Stammzellen
4	8	Natürliche und induzierte regulatorische T-Zellen
5	18	Querschnitt einer Nabelschnur
6	18	Präparation einer Nabelschnur
7	25	Beispiel für eine CFSE-Proliferationsanalyse
8	26	Messmaske des Zytotoxizitätstests
9	29	Morphologie von mesenchymalen Stammzellen
10	30	Durchflusszytometrische Analyse von UCMSC
11	32	Proliferation von UCMSC in Passage 1 und in Passage 5
12	33	Adipogene und Osteogene Differenzierungsfähigkeit von UCMSC unter verschiedenen Kulturbedingungen
13	34	Endotheliale Differenzierung von UCMSC unter verschiedenen Kulturbedingungen
14	35	vWF-Färbung
15	36	Matrigel™ Angiogenese-Test
16	37	CFSE-Proliferationsanalyse einer allogenen MLR
17	38	Allogene MLR im Transwell-System
18	39	Bestimmung der PGE ₂ -Konzentration
19	39	Inhibition einer MLR durch Zugabe von UCMSC
20	40	Inhibition einer MLR durch Zugabe von UCMSC; Zugabe von 1-MT

21	42	Durchflusszytometrische Analyse von CD4+/CD25+/FoxP3+ Treg-Zellen und konventionellen T-Zellen
22	42	Durchflusszytometrische Analyse von CD4+/CD25+/FoxP3+ Treg-Zellen
23	43	Funktionelle Charakterisierung der Treg-Zellen
24	44	Zytotoxizitätstest (CD8+, CD28- und CD28+ CTL)
25	45	Zytotoxizitätstest (CD28+, CD28- CTL \pm Treg-Zellen)
26	46	Zytotoxizitätstest (CD28- CTL \pm Treg-Zellen \pm TW)
27	46	Treg-Zellen verstärken die lytische Aktivität von CD28- CTL (drei verschiedene Spender, fünf verschiedene Endothelzelllinien)
28	47	Phänotypische Analyse von CD28- und CD28+ CTL
29	48	Phänotypische Analyse von CD28- und CD28+ CTL
30	50	Phänotypische Analyse von CD8+, CD57+ und CD57- CTL
31	50	Phänotypische Analyse von CD8+, CD57+ und CD57- CTL (vor und nach Stimulierung)
32	51	Zytotoxizitätstest (Vergleich CD8+, CD57+ und CD57- CTL)
33	52	Zytotoxizitätstest (CD8+, CD57+ CTL \pm Treg-Zellen)
34	53	Zytotoxizitätstest (HMEC \pm UCMSC)
35	54	Zytotoxizitätstest (eUCMSC)
36	55	Durchflusszytometrische Analyse A: SSC-Apoptose (HMEC) B: SSC-Apoptose (eUCMSC)
37	56	Durchflusszytometrische Analyse (CD54, MHC-Klasse-I)
38	66	Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse der Raman Spektren von UCMSC

9.3 Tabellenverzeichnis

Tabellen-Nr.	Seite	Titel
1	29	UCMSC Präparationen
2	31	Auswertung durchflusszytometrischer Kontrollen von UCMSC
3	49	Phänotypische Analyse von CD8+ CTL

10 Publikationen

- 1) Hartmann, I., Hollweck, T., Haffner, S., Krebs, M., Meiser, B., Reichart, B., Eissner, G. Umbilical cord tissue-derived mesenchymal stem cells grow best under GMP-compliant culture conditions and maintain their phenotypic and functional properties. *Journal of Immunological Methods*. 2010. 363:80-89
- 2) Hollweck, T., Marschmann, M., Hartmann, I., Akra, B., Meiser, B., Reichart, B., Eblenkamp, M., Wintermantel, E., Eißner, G. Comparative analysis of adherence, viability, proliferation, and morphology of umbilical cord tissue-derived mesenchymal stem cells seeded on different titanium-coated expanded polytetrafluorethylene scaffolds. *Biomedical Materials*. 2010. 5(6): 065004
- 3) Eissner, G., Hartmann, I., Kesikli, A., Holler, E., Haffner, S., Sax, T., Schray, C., Meiser, B., Reichart, B. CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells enhance the allogeneic activity of endothelial-specific CD8+CD28-CTL. *International Immunology*. 2011. 23:485-492
- 4) Hollweck, T., Hartmann, I., Eblenkamp, M., Wintermantel, E., Reichart, B., Überfuhr, P., Eissner, G. Cardiac Differentiation of Human Wharton's Jelly Stem Cells – Experimental Comparison of Protocols. *The Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine Journal*. 2011. 4:95-102

11 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, 16. Dezember 2013

Isabel Hartmann

12 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Günther Eißner danke ich für die Vergabe dieses sehr interessanten Dissertationsthemas, für die Betreuung und die stetige Unterstützung meiner Arbeit. Seine wertvollen Anregungen und Ratschläge habe ich immer sehr geschätzt.

Herrn Prof. Dr. Dr. Bruno Reichart danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit in der Forschungsgruppe Interdisziplinäre Stammzellforschung von Herrn Prof. Dr. Günther Eißner an der Herzchirurgischen Klinik der Universität München durchführen zu können.

Frau Prof. Dr. Elisabeth H. Weiss danke ich dafür, dass sie Ihr Einverständnis zur Durchführung dieser Arbeit an der Herzchirurgischen Klinik der Universität München gegeben hat und mir als Betreuerin zur Seite stand.

Den Mitarbeitern der Geburtsstation der Wolfart-Klinik Gräfelfing danke ich für Ihre Hilfe bei der Sammlung der Nabelschnurpräparate.

Frau Dr. Marieke Pudlas, aus der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Heike Walles (Julius-Maximilians-Universität Würzburg), danke ich für die Durchführung der Untersuchungen mittels Raman-Spektroskopie am Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB Stuttgart.

Mein ganz besonderer Dank gilt allen meinen Arbeitskollegen die mich in dieser Zeit begleitet haben, insbesondere Dr. Trixi Hollweck und Dr. Seema Noor, für die immer ausgesprochen angenehme Arbeitsatmosphäre, die wertvollen Diskussionen und die Zusammenarbeit. Vielen Dank für diese unvergessliche Zeit.

Mein herzlichster und tiefstempfundener Dank gilt meinen Eltern. Vielen Dank für Eure fortwährende Unterstützung und Euer stetiges Interesse an meiner Arbeit.

13 Lebenslauf

Name Isabel Alexandra Hartmann

Ausbildung und Beruflicher Werdegang

- seit 10/2013 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin**
Bioregeneration GmbH
- 04/2008 – 09/2013 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin**
Labor für Interdisziplinäre Stammzellforschung (Prof. Dr. G. Eißner),
Herzchirurgische Klinik der Universität München,
Klinikum Großhadern
Dissertationsthema: Wechselwirkung immunmodulatorischer Zellen
mit vaskulären Endothelzellen
- 07/2006 – 04/2007 **Diplomarbeit**
Lehrstuhl für Anthropologie und Humangenetik (Prof. Dr. E. Weiss),
Ludwig-Maximilians-Universität München
Titel: Etablierung eines Reporterzellsystems für CD94/NKG2A-
Interaktionen
- 10/2001 – 09/2007 **Diplomstudium der Biologie**
Ludwig-Maximilians-Universität München
- 06/2001 **Abitur**
Carl-Spitzweg-Gymnasium Unterpfaffenhofen